

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**NIVELES DE INTERFERONES TIPO I Y III EN MUCOSA NASAL
DE PACIENTES INFECTADOS CON VIRUS RESPIRATORIOS**

POR

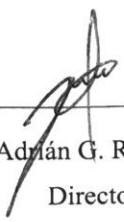
M.C.P. JORGE ARMANDO GONZALEZ CHAPA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOLOGÍA MÉDICA**

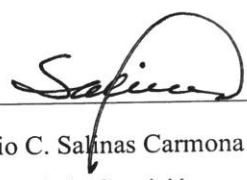
JULIO, 2017

**NIVELES DE INTERFERONES TIPO I Y III EN MUCOSA NASAL DE
PACIENTES INFECTADOS CON VIRUS RESPIRATORIOS.**

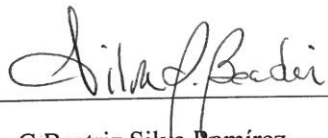
Aprobación de la Tesis:



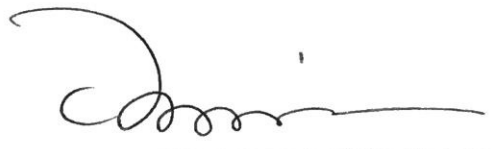
Dr. C Adrián G. Rosas Taraco
Director



Dr. C Mario C. Salinas Carmona
Miembro de la Comisión



Dr. C Beatriz Silva Ramírez
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios y a mi familia por el apoyo incondicional brindado no solo durante estos dos años sino siempre.

Agradezco a el Dr. Adrián Rosas por su orientación, paciencia y apoyo a mi crecimiento profesional y personal.

Agradezco a el Dr. Salinas Carmona por aceptarme y darme la oportunidad de estar en el Servicio de Inmunología así como por su guía personal y profesional.

Agradezco a la Dra. Beatriz Silva por su apoyo y consejos para el crecimiento profesional.

Agradezco a la química Azalia Castilla por todo su apoyo y paciencia durante estos dos años ya que gracias a ella se superaron muchas situaciones profesionales y personales.

A CONACYT por la beca nacional otorgada (CVU/Becario 708282/582184) , beca mixta para estancia en el extranjero y por los fondos otorgados (2013-01-281871) hacia el proyecto de investigación.

GRACIAS.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo y esfuerzo a Dios y mi familia .

Tabla de contenido

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN.....	2
INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS.....	2
<i>Definición y etiología</i>	<i>2</i>
<i>Diagnóstico y Tratamiento</i>	<i>4</i>
<i>Prevención.....</i>	<i>4</i>
<i>Entidades clínicas en una IRA.....</i>	<i>5</i>
AGENTES VIRALES ASOCIADOS CON IRA.....	11
<i>Rinovirus humano.....</i>	<i>11</i>
<i>Virus Sincitial Respiratorio (RSV).....</i>	<i>14</i>
<i>Metaneumovirus Humano (hMPV).....</i>	<i>16</i>
RESPUESTA INMUNE ANTIVIRAL.....	17
MONOINFECCIÓN VS CO-INFECCIÓN	23
ANTECEDENTES	26
JUSTIFICACIÓN	29
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	33
ESTRATEGIA GENERAL Y SELECCIÓN DE LOS PACIENTES	33
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	34
IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES VIRALES.....	35
DETECCIÓN DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	39
ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) TIPO “SÁNDWICH” PARA DETERMINACIÓN DE IFN- λ 1	39
ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) TIPO “SÁNDWICH” PARA DETERMINACIÓN DE IFN-B	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	42
RESULTADOS	44
PACIENTES	44
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.....	45
NIVELES DE IFN- λ 1 EN PACIENTES MONOINFECTADOS CON RINOVIRUS, RSV Y METANEUMOVIRUS	49
NIVELES DE IFN- β EN PACIENTES MONOINFECTADOS CON RINOVIRUS, RSV Y METANEUMOVIRUS	52
ESTADO CLÍNICO DE LOS PACIENTES Y SU ASOCIACIÓN CON LOS AGENTES VIRALES.....	53

DISCUSIÓN..... 72

CONCLUSIÓN 77

PERSPECTIVAS..... 79

REFERENCIAS..... 81

ANEXOS..... 88

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 90

Lista de símbolos y abreviaturas

- IRA (infección respiratoria aguda)
- HRV (rinovirus humano)
- RSV (virus sincitial respiratorio)
- hMPV (metaneumovirus humano)
- ARN (ácido ribonucleico)
- ADN (ácido desoxiribonucleico)
- PRR(receptor de reconocimiento de patrones)
- PAMP (patrón molecular asociado a patógeno)
- DAMP (patrón molecular asociado a daño)
- TLR(receptores tipo Toll)
- NLR(receptores tipo Nod)
- RLR(receptores tipo Rig)
- IFN (interferón)
- PCR(reacción en cadena de la polimerasa)
- ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- CRUP (laringotraqueobronquitis)
- CCA(agente de coriza de chimpancé)
- Kb (kilobase)
- α (alpha)
- β (beta)
- λ (lambda)

Lista de tablas

- Tabla 1. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para detección de agentes virales utilizando el kit xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2.
- Tabla 2. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para cargas virales utilizando estuches de Genesig y QuantiNova
- Tabla 3. Escala de clasificación de pacientes pediátricos
- Tabla 4. Escala de clasificación pacientes adultos
- Tabla 5. Pacientes adultos y pediátricos monoinfectados con Rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.
- Tabla 6. Características de las poblaciones de pacientes adultos y pediátricos con IRA.
- Tabla 7. Poblaciones de estudios y controles estuvieron pareadas por edad y genero
- Tabla 8. Características clínicas y sociodemográficas específicas de población adulta monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.
- Tabla 9. Características clínicas y sociodemográficas específicas de población pediátrica monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.
- Tabla 10. Gravedad clínica de la infección viral en la población adulta y pediátrica.
- Tabla 11. Gravedad clínica de la infección viral en la población adulta.
- Tabla 12. Gravedad clínica de la infección viral en la población pediátrica.
- Tabla 13. Características de los pacientes adultos monoinfectados con rinovirus y sus cargas virales
- Tabla 14. Características de los pacientes adultos monoinfectados con RSV y sus cargas virales

- Tabla 15. Características de los pacientes adultos monoinfectados con hMPV y sus cargas virales.
- Tabla 16. Edad y gravedad clínica de los pacientes infectados por Rinovirus, RSV, Metaneumovirus humano.
- Tabla 17. Género y gravedad clínica de los pacientes infectados por Rinovirus y RSV.
- Tabla 18. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por rinovirus humano.
- Tabla 19. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por RSV.
- Tabla 20. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por hMPV.
- Tabla 21. Edad y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV y hMPV.
- Tabla 22. Género y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV y Metaneumovirus humano.
- Tabla 23. Antecedente de alimentación con seno materno y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV.
- Tabla 24. Diagnóstico y la gravedad de la enfermedad de pacientes infectados con RSV y hMPV.
- Tabla 25. Antecedente de exposición a humo de cigarro y la gravedad de la enfermedad de pacientes infectados con RSV.

Lista de figuras

- Figura 1. Curva estándar y ecuación de la recta obtenida para IFN- λ 1.
- Figura 2. Curva estándar y ecuación de la recta obtenida para IFN- β .
- Figura 3. Fechas de toma de muestras de los pacientes monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.
- Figura 4. Niveles de IFN- λ 1 en mucosa nasal de las diferentes poblaciones monoinfectadas con los diferentes virus estudiados.
- Figura 5. Los pacientes masculinos monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano presentaron mayores niveles de IFN- λ 1.
- Figura 6. Los pacientes adultos fumadores con monoinfección presentan menores concentraciones de IFN- λ 1.
- Figura 7. Los pacientes hospitalizados infectados con Rinovirus, RSV y hMPV muestran mayores niveles de IFN- λ 1 comparado con los ambulatorios, prueba U Mann Whitney (P= 0.02).
- Figura 8. Los pacientes hospitalizados infectados con RSV muestran mayores niveles de IFN- λ 1 comparado con los ambulatorios, prueba U Mann Whitney (P= 0.02).
- Figura 9. Los niveles de IFN- λ 1 predominan sobre IFN- β .
- Figura 10. Correlación de los niveles de IFN- β y la carga viral del hMPV. Prueba de correlacion de Spearman (P<0.0001, r= -0.86).
- Figura 11. Pacientes con antecedentes alérgicos infectados con RSV mostraron una mayor carga viral comparada con aquellos no alérgicos. U Mann Whitney p= 0.01

RESUMEN

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título: Niveles de interferones tipo I y tipo III en mucosa nasal de pacientes infectados con virus respiratorios.

Número de páginas: 102

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunología Médica

Introducción: Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son la principal causa de morbi-mortalidad y en nuestro país se reportan más de 20 millones de casos al año. Los virus son los agentes etiológicos más comunes, por lo que es necesario estudiar la respuesta antiviral de interferones contra virus respiratorios en mucosa nasal.

Objetivo: Determinar los niveles de IFNs tipo I y III en mucosa nasal de pacientes mono infectados por los virus respiratorios.

Material y Métodos: Se seleccionaron pacientes adultos y pediátricos. Muestras de exudado faríngeo y lavado nasal fueron obtenidas para determinar el agente etiológico y los niveles de IFNs.

Resultados: El rinovirus afecto con mayor frecuencia y gravedad a los pacientes adultos mientras que el RSV lo hizo en pacientes pediátricos. El hMPV afecto con mayor frecuencia a los pacientes pediátricos y el virus más común identificado fue el RSV tanto en adultos como pediátricos en forma de mono infección. Los pacientes pediátricos hospitalizados infectados con los virus respiratorios presentaron mayores concentraciones de IFN- λ 1, mientras los pacientes adultos masculinos mostraron mayores concentraciones de IFN- λ 1 comparados con los femeninos ($P<0.05$). Los pacientes adultos fumadores así como aquellos infectados con el hMPV presentaron menores concentraciones de IFN- λ 1 y de IFN- β , respectivamente ($P<0.05$). El IFN- λ 1 predominó en la infección por los virus respiratorios. Los pacientes adultos alérgicos presentaron una mayor carga viral de RSV comprado con los no alérgicos ($P<0.05$).

Conclusión: Los virus respiratorios estudiados inducen la producción de IFN tipo I y III en la mucosa nasal de los pacientes infectados, los niveles de estos fueron afectados por factores propios de la infección y de los pacientes; y finalmente el IFN- λ 1 predomino en estas infecciones.

Dr. C Adrián G. Rosas Taraco

Director de Tesis

ABSTRACT

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Title: Interferons type I and type III levels in the nasal mucosa of patients infected with respiratory viruses.

Number of pages: 102

Candidate for a Master of Science Degree in Medical Immunology

Introduction: Acute respiratory infections (ARI) are the main cause of morbidity and mortality; Mexico reports more than 20 million cases per year. Viruses are the most common etiological agents, so it is necessary to study the antiviral response of interferons against respiratory viruses.

Objective: Determine IFNs type I and III levels in the nasal mucosa of patients monoinfected by respiratory viruses.

Material and Methods: Adult and pediatric patients were selected. Samples of pharyngeal exudate and nasal lavage were obtained to determine the etiologic agent and IFNs levels.

Results: Rhinovirus affected with more frequency and severity adult patients, while RSV did in pediatric patients. HMPV was most frequently in pediatric patients and the most common virus identified was RSV in both adults and pediatric patients. In-hospital patients infected with the virus had higher concentrations of IFN- λ 1, as well as adult male patients who had higher IFN- λ 1 concentrations. Adult smokers as well as those infected with hMPV had lower concentrations of IFN- λ 1 and IFN- β , respectively. IFN- λ 1 predominated in the presence of respiratory virus infection. Adult patients with allergies history had a higher viral load compared to those without allergy history during the RSV infection.

Conclusion: Respiratory viruses induced the production of type I and III IFNs in the nasal mucosa of the infected patients, the levels of these were affected by different factors of the infection and of the patients; And finally IFN- λ 1 was predominant in these infections.

Dr. C Adrián G. Rosas Taraco

Director de Tesis

INTRODUCCIÓN

Introducción

Infecciones respiratorias agudas

Definición y etiología

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) son un conjunto de padecimientos infecciosos de las vías respiratorias con una evolución menor de 15 días en promedio. Las IRAs son un gran problema de salud pública debido a la gran morbi-mortalidad que presentan, solo en México son la mayor causa de consultas al médico y atención hospitalaria (1). La Organización Mundial de la salud describe factores de riesgo que favorecen este tipo de padecimientos, entre ellos se encuentran los factores ambientales, individuales y sociales. Entre los factores ambientales se encuentran la contaminación del mismo ambiente o en el hogar, el tabaquismo pasivo o activo, una deficiente ventilación en la vivienda, los cambios bruscos de temperaturas, asistencia a lugares públicos con mucha concentración de personas la cual puede favorecer el contacto con personas enfermas de IRA. Los factores individuales que predisponen este tipo de infecciones son la edad, la cual se relaciona con mayor gravedad de la enfermedad en personas menores de 2 años y mayores de 65 años, el antecedente de bajo peso al nacer así como la ausencia de lactancia materna, la desnutrición en cualquier etapa de la vida, el haber padecido infecciones previas del mismo tipo, poseer un esquema de vacunación incompleto y la ausencia de diversos minerales y vitaminas como la vitamina A. Entre los factores sociales se encuentran el hacinamiento y el tipo de vivienda (2).

El tracto respiratorio se divide en vía aérea superior y vía aérea inferior y según la gravedad de la enfermedad una IRA puede evolucionar sin neumonía, la cual es la complicación más común de esta, en estos casos los pacientes presentan signos y síntomas por lo general relacionadas con la vía aérea superior como tos, rinorrea, fiebre, otorrea, disfonía, exudado purulento en la faringe y en ocasiones odinofagia. Cuando la IRA se presenta con una neumonía la vía aérea inferior ya se vio involucrada y a la sintomatología se agrega la disnea en los pacientes marcando así un agravamiento de la enfermedad y si esta persiste y no se trata correctamente puede evolucionar a una neumonía grave cursando con cianosis y tiraje intercostal, incluso llegando a la muerte.

Es sumamente importante prestar atención a los datos de alarma en estas infecciones como la dificultad respiratoria sea cual sea la edad de los pacientes, el rechazo de los líquidos y alimentos, la somnolencia o el insomnio, la fiebre persistente y la cianosis peribucal.

La etiología de este tipo de infecciones puede ser por cualquier patógeno ya sea bacteria, hongo, parásito o virus, pero las etiologías más frecuentes son debidas a virus y bacterias. En el caso de los menores de 5 años de edad estos son debido mayormente a causa viral de los cuales entre los más comunes se encuentran el rinovirus, virus sincitial respiratorio, influenza, parainfluenza e incluso el recientemente descubierto metaneumovirus, el cual se ha visto que desde su descubrimiento en 2001 los casos de IRA causados por este han ido en aumento.(3) Dentro de una sección más adelante se describirán detalladamente algunos de los virus más comunes, el cual es el propósito de este trabajo.

Dentro de las bacterias más comunes que son las causantes de este tipo de infecciones se encuentran *S. pyogenes*, *H. influenza*, *S. aureus* y *M. catarrhalis* y , *S. pneumoniae* siendo esta última el agente etiológico más común en neumonías adquiridas en la comunidad. Las infecciones respiratorias agudas puede existir de manera de mono infección o como una co-infección ya sea con algún otro virus o bacteria, e incluso se ha descrito que las co-infecciones de virus con bacterias agravan el estado clínico de los pacientes(4). Este tipo de infecciones si no se tratan de la manera correcta pueden evolucionar de un simple resfriado común a una neumonía ya sea grave o leve, una bronquiolitis, una bronquitis o incluso exacerbar el asma en aquellos pacientes que lo padezcan. El que se encuentren los agentes etiológicos como co-infecciones dificulta en ocasiones el diagnóstico de estas enfermedades, ocasionando gran número de errores de tratamientos de la enfermedad llegando así a complicaciones graves como la neumonía y en muchos casos la muerte de los pacientes. Debido a la gran frecuencia de las IRA en el mundo es necesario establecer y unificar criterios diagnósticos para así poder tratar correctamente este tipo de enfermedades ya que son las causantes de aproximadamente 4-5 millones de muertes al año y se estima que son las responsables del 6% de incapacidades y muerte a nivel global(5).

Diagnóstico y Tratamiento

Los criterios diagnósticos y las guías de tratamiento para las ARI no están unificados a nivel global como se mencionó previamente. Durante una revisión por el médico este se enfoca en un examen respiratorio en el cual ausculta los campos pulmonares para verificar la presencia de sonidos anormales durante la respiración. Si el médico considera la posibilidad que la infección respiratoria aguda se encuentra en la vía aérea inferior y no en la superior este puede apoyarse con exámenes de rayos X del tórax o un tomografía computada de la misma región para verificar la condición de los pulmones. Es necesario tomar en cuenta la pulsoximetría la cual indica el nivel de saturación de oxígeno que presenta el paciente, el médico puede corroborar su diagnóstico clínico de la infección mediante la toma de un lavado nasal o exudado faríngeo el cual es el método más común de diagnóstico del agente etiológico, así como también puede tomarse una muestra de esputo para el mismo uso, estas muestras ayudarán al diagnóstico del agente etiológico viral o bacteriano por lo general mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o cultivos microbiológicos para así poder otorgar al paciente un tratamiento más adecuado, aunque por lo general este método no es muy utilizado debido al costo de los análisis por lo que las infecciones comúnmente se clasifican como inespecíficas. Por lo general, el tratamiento para una IRA sin neumonía incluye incrementar la ingesta de líquidos, mantener la alimentación habitual, en el caso de los menores de 1 año de edad no suspender la lactancia, controlar la temperatura corporal es sumamente importante y esto se logra por medios físicos cuando es menor a 38 °C como tomar un baño o por medio de medicamentos como acetaminofén, el uso de antibióticos se opta por aquellos pacientes que tienen una rinofaringitis, faringitis, laringitis o en el caso de que se presente una neumonía la cual ya indicaría una IRA grave. El uso de broncodilatadores como salbutamol es recomendado en aquellos pacientes con disnea.(6).

Prevención

Debido a la gran morbimortalidad que causan las IRA es sumamente importante tomar en cuenta y dar la importancia debida a las medidas de prevención para así poder disminuir el riesgo de contraer una ARI. Para poder prevenir se debe de conocer en

primera instancia el mecanismo de transmisión de la enfermedad, el cual puede ser de dos maneras, la primera es a través de microgotas respiratorias de una persona infectada que entran en contacto con otra persona, por ejemplo un estornudo o tos. La segunda es a través de fómites como pañuelos, ropa o cualquier otra superficie que estuviera en contacto con los aerosoles respiratorios de la persona infectada y mediante una distancia muy corta pueda entrar en contacto con la persona no infectada. El período de incubación de cualquier patógeno causante de la IRA es de 1-4 días aproximadamente y que la persona puede empezar a contagiar un día antes del inicio de los síntomas hasta 3-5 días después del comienzo de estos. El personal de salud como médicos, enfermeras, químicos, y todos aquellos que trabajen con pacientes o muestras biológicas de estos están en constante riesgo de infectarse y contraer una IRA por lo que se recomienda tomar medidas preventivas. Las medidas preventivas no solo se aplican a las personas en contacto con los pacientes o infectados si no a la infraestructura de donde se encuentran los pacientes en el caso de hospitales o clínicas como por ejemplo mantener más de un metro de distancia entre los pacientes, mantener bien ventiladas las habitaciones ya sea con ventilación mecánica o natural y es recomendable también limpiar todas aquellas superficies que estuvieron en contacto con dichos pacientes y el correcto desecho de fómites. Para personal no de salud o en áreas no hospitalarias solo es recomendable el correcto lavado de manos así como evitar contacto con fómites y permanecer en áreas bien ventiladas (7). Algunas IRAs pueden causar brotes a gran escala, con alta morbilidad y pueden constituir una emergencia nacional o internacional de salud pública por lo que la prevención es sumamente importante.

Entidades clínicas en una IRA

Según la localización de la infección respiratoria aguda las complicaciones o entidades clínicas pueden ser diversas, pueden localizarse en vía área superior o en vía aérea inferior generando así diversas entidades clínicas.

Infecciones respiratorias altas/superior

Estas infecciones son las que afectan la nasofaringe, orofaringe, laringe, tráquea, oído y senos paranasales

Resfriado común (Rinitis)

Este padecimiento se caracteriza por la inflamación de la mucosa nasal y es una de las infecciones más frecuentes en todo el mundo, este tipo de infecciones declinan con la edad presentando así lo menores de 2 años 6 infecciones al año aproximadamente , los adultos con 3 infecciones y las personas de la tercera edad con 4, aproximadamente (8). La historia natural de la enfermedad es de 7-10 días aunque en ocasiones puede llegar a durar 3 semanas. La etiología comúnmente se debe a agentes virales, los más comunes son el rinovirus, el virus sincitial respiratorio y enterovirus y coronavirus, siendo el más frecuente el rinovirus. Este tipo de infecciones ocurre por lo general en meses fríos del año pero dependiendo del virus existe una incidencia estacional diferentes como por ejemplo el rinovirus en otoño y el virus sincitial respiratorio en invierno. Una descripción de los agentes virales más detallada se llevará a cabo en la sección de virus más adelante. La replicación ocurre en las células del epitelio nasal, por lo que los síntomas se deben el edema e hiperemia de la mucosa nasal y respiratoria así como la destrucción de dichas células epiteliales. Las manifestaciones clínicas dependen del estado del huésped así como del agente etiológico y puede ser tan solo escurrimiento nasal, edema de la mucosa estornudos, congestión nasal y conjuntival, pueden presentarse síntomas sistémicos como la fiebre. La enfermedad es auto limitada por lo que no requiere un tratamiento específico además que no se dispone de fármaco antivirales para la mayoría de estos virus.(9)

Faringitis y amigdalitis

Este tipo de entidad clínica es frecuente tanto en adultos como pacientes pediátricos. La mayoría de las faringoamigdalitis son virales pero puede existir también agentes etiológicos bacterianos. Virus como el rinovirus, herpes simplex (1y 2) y coronavirus son de los agentes más comunes de este padecimiento y en el caso de las bacterias *S.*

pyogenes es el principal agente relacionado con esta entidad clínica. Las infecciones ocurren durante todo el año pero tienen su pico de incidencia en primavera. El grupo más afectado de población son las personas de 5-15 años. La infección también depende del estado inmunológico del paciente ya que se ha relacionado mayores infecciones durante periodos de estrés. El período de incubación por lo general es de 4 días y el cuadro clínico más característico es por lo general la odinofagia acompañada de vómitos y fiebre en ocasiones. Para el diagnóstico de este padecimiento es sumamente importante poder diferenciar una infección viral de una bacteriana, y para esto se utiliza el exudado faríngeo como prueba de gold standard. El tratamiento por lo general está dirigido a evitar complicaciones como supuradas y las no supuradas como fiebre reumática o glomerulonefritis en el caso de las causadas por bacterias, por lo que identificando el agente etiológico se deberá manejar con antibióticos correspondientes o sintomático en el caso de virales(10).

Laringotraqueobronquitis (CRUP)

Es una infección viral vinculada con la edad la cual produce una inflamación del área subglótica lo que lleva a un característico cuadro clínico de estridor inspiratorio y disnea. Esta enfermedad se presenta en niños principalmente menores de 2 años de edad y representa aproximadamente el 15% de las IRA en los niños predominando en el sexo masculino (11). La causa más común de este padecimiento es el virus de la gripe A seguido del tipo 3. Es importante comentar que la máxima incidencia de estos casos es durante otoño. La infección se presenta con un cuadro clínico que inicia en tracto respiratorio superior la cual si no se trata correctamente progresa hasta involucrar tracto respiratorio inferior. Los signos como el estridor y las sibilancias así como la tos resultan por la inflamación de la laringe y la tráquea. Es un padecimiento grave ya que la enfermedad se manifiesta principalmente al anochecer acompañada de fiebre, polipnea, disnea el cual puede agravarse hasta la muerte. El diagnóstico de la enfermedad es clínico y el tratamiento es sintomático con el objetivo de mejorar la permeabilidad de la vía aérea (12).

Epiglotitis

Este padecimiento resulta en una obstrucción laríngea debido a un edema supra glótico, se diferencia de la laringitis en que esta ocurre en niños mayores de dos años de edad y que es común también en personas adultas. La etiología de este padecimiento es por lo general bacteriana siendo el agente más común *H. influenzae* tipo b. Los síntomas que se presentan son la odinofagia, fiebre, disfagia y la disnea debido a la obstrucción de la vía aérea. Para el diagnóstico se toma secreción respiratoria para poder realizar cultivos y poder dar el tratamiento adecuado de antibióticos y restablecer el flujo de aire adecuado en la vía aérea (13).

Otitis media aguda y otitis externa

Este padecimiento se caracteriza por la inflamación del oído medio en una manera aguda. Por lo general afecta principalmente a niños y adolescentes. *S. pneumoniae* es el agente más comúnmente asociado a este padecimiento seguido de *H. influenzae* sumando así el 90% de las causas de esta entidad clínica. La población pediátrica es la más afectada debido a que por razones anatómicas en esta etapa de la vida la trompa de Eustaquio presenta una disfunción en la protección del oído medio frente a secreciones de la nasofaringe. Este padecimiento se presenta con otalgia, hipoacusia, fiebre, anorexia y en ocasiones vómitos y otorrea. Para el diagnóstico se debería de utilizar la timpanocentesis pero debido a la agresividad del procedimiento por lo general únicamente se trata de manera empírica con antibióticos (14). En los casos de otitis externa la infección y la inflamación se localiza en el conducto auditivo externo y por lo general se asocia con factores de riesgo como humedad y calor. Los principales agentes etiológicos son *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El diagnóstico se realiza mediante la toma de muestra de exudado del conducto auditivo externo pero debe de realizarse con precaución debido a que también se presentarían agentes de la microbiota de la piel (15).

Sinusitis aguda

La inflamación de la mucosa de los senos paranasales de menos de 4 semanas de evolución afecta frecuentemente a población adulta como la pediátrica. Es importante comentar que muchos de los agentes que causan este padecimiento son los mismos que los causantes de las otitis (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*). Las manifestaciones clínicas por lo general incluyen tos y rinorrea pero en ocasiones puede acompañarse de fiebre y cefaleas frontales que aumentan con la posición en declive. Para el diagnóstico se requiere procedimientos invasivos por lo que comúnmente no se practica y se trata empíricamente con antibióticos y en casos más extremo puede acompañarse con drenaje quirúrgico. (16)

Infecciones respiratorias bajas/inferiores

Estas infecciones tienen una localización en las vías respiratorias bajas como la tráquea, bronquios, bronquiolos, así como tejido alveolar y parénquima pulmonar.

Bronquitis aguda

Este es un trastorno inflamatorio del árbol traqueo bronquial que se presenta sobre todo en meses invernales. Afecta población adulta y pediátrica. La etiología es viral por lo general siendo el rinovirus, coronavirus e influenza de los más comunes sin embargo también se ha asociado *M. pneumoniae* a este padecimiento. Durante este padecimiento se encuentra una gran cantidad de secreción bronquial debido a el edema y la hiperemia de la mucosa bronquial aunada a la destrucción del epitelio respiratorio. Esto se suele acompañar de tos productiva, y en la auscultación se pueden encontrar estertores acompañado de fiebre en algunos casos. No existe un tratamiento en específico y por lo general es sintomático (17).

Bronquiolitis

Esta enfermedad se localiza en el tracto respiratorio inferior y se caracteriza porque aparece durante los 2 primeros años de vida. Se caracteriza por un patrón estacional definido en invierno y primavera y principalmente ha sido asociado a el virus sincitial respiratorio sin embargo el metaneumovirus también ha sido asociado. Es común

durante los primeros 2 a 10 meses de vida y presenta una mayor frecuencia en varones (relación 1.5-1). El principal factor de riesgo para esta enfermedad es la edad de los pacientes, el hacinamiento en el hogar y la mala ventilación. La patología de la bronquiolitis se concentra en el epitelio respiratorio en cual es infectado por el virus replicándose hasta alcanzar las vías aéreas inferiores ocasionando muerte celular por necrosis originando así tapones necróticos que obstruyen a la vía aérea del lactante. Al inicio de la enfermedad se presenta tos para después presentarse fiebre acompañada de polipnea, somnolencia, tos sibilante, aleteo nasal y quejido inspiratorio. Si la enfermedad no se trata correctamente puede llegar a la apnea ocasionando la muerte del lactante(18).

Neumonía aguda

Esta enfermedad se caracteriza por inflamación en el parénquima pulmonar y puede ser causada por agentes virales, bacterianos, hongos y parásitos. Se caracteriza por fiebre, sintomatología respiratoria variable y la aparición de infiltrados en la radiografía. Por lo tanto esta entidad es de diagnóstico clínico, radiológico y evolutivo. Presenta una mayor incidencia en las edades extremas de la vida y es importante destacar que representa un gran problema de salud mundial debido a la gran morbilidad y mortalidad que presenta y los costos elevados de parte de las diversas instituciones de salud. Se ha dividido en tres grupos principales, neumonía adquirida en la comunidad en la cual se encuentran los pacientes pediátricos y mayores de 65 años , la neumonía aguda intrahospitalaria la cual es aquella que se presenta después de 72 horas de estancia hospitalaria o aquellos pacientes que egresan del nosocomio y presentan síntomas durante los primeros 7 días del alta, neumonía en inmunodeprimidos la cual comprende a los pacientes con alguna inmunodeficiencia como SIDA o pacientes que se encuentran en tratamiento con medicamentos que puedan disminuir la respuesta inmune. La neumonía adquirida en la comunidad es la presentación más común de la clasificación y como agente etiológico más común se encuentra *S. pneumoniae* seguido de *H. influenzae* (19). Fisiológicamente los mecanismos de defensa pulmonares mantienen estériles las vías aéreas infra glóticas por lo que el desarrollo de una neumonía implica un defecto en las defensas del huésped. La vía de llegada de los microorganismos al parénquima pulmonar es por vía descendente por aspiración de material aerolizado proveniente de otra persona infectada

con una IRA. Es importante comentar que para que estos microorganismos alcancen el parénquima pulmonar deben pasar por varias barreras tanto físicas como químicas del sistema respiratorio. Por lo general los síntomas aparecen después de un cuadro catarral, iniciando con tos seca para después evolucionar a una productiva o mucopurulenta, puede presentarse fiebre y diaforesis nocturna, vómitos, rinorrea, náuseas, astenia, adinamia, lo cual ayuda al diagnóstico clínico apoyándose con radiografías de tórax. El tratamiento debe ser oportuno debido a que puede llegar a culminar en la muerte de los pacientes. Este debe ser orientado según la etiología de la enfermedad aunque por lo general se realiza de manera empírica de acuerdo a la frecuencia de los agentes mencionados utilizando antibióticos o en el caso de un agente etiológico viral el uso de oxígeno de soporte y esteroides para disminuir la inflamación del tejido así como medicamentos antiinflamatorios y antipiréticos(20).

Agentes virales asociados con IRA

Las infecciones respiratorias agudas pueden ser causadas por más de 250 tipos de virus, sin embargo entre los más comunes se encuentran el rinovirus, el virus sincitial respiratorio y el recientemente descubierto metaneumovirus (21). En esta sección se hablara específicamente de estos tres virus debido a que son el enfoque del trabajo de esta tesis. Sin embargo hay muchos otros que pueden causar estas infecciones y que también tienen una incidencia alta como el virus de la influenza.

Rinovirus humano

Pertenece a la familia de picornavirus, los cuales se les nombraron así en el año de 1963 debido a que son de pequeño tamaño y contenido en ácido ribonucleico (ARN) y no ADN, además del rinovirus en esta familia se encuentran los enterovirus, hepatovirus, cardiovirus, alfavirus y parechovirus. Este agente patógeno es de los más comunes en los humanos y existen más de 110 tipos serológicos capaces de provocar enfermedad. Fue por primera vez aislado en 1956 por el Winston Price. Su mayor aislamiento es en secreciones de tracto respiratorio y presenta una estabilidad en pH ácido lábil, su temperatura óptima de crecimiento es de 33°C. El virión del rinovirus es de forma

icosaedro de 28-30nm de diámetro y contiene 60 subunidades. Está compuesto de ARN en un 30% y de proteínas en un 70%. El genoma se compone de ARN de cadena única lineal, sentido positivo de 7-8 kb de tamaño. No posee envoltura y su replicación es a nivel del citoplasma. Está compuesto por una cápside que contiene 4 proteínas virales: VP1, VP2, VP3 y VP4. Puede existir una quinta proteína la cual es VPO, esto si el clivaje para formar VP2 y VP4 no es completo durante el ensamblaje del virión. Las primeras tres forman la mayor parte de la cápside y la última posee un tamaño mucho menos y se sitúa en la interfaz entre la cápside y el genoma de ARN (22). El genoma de los virus de este tipo se componen como se mencionó de una cadena única de ARN la cual contiene aproximadamente 7400 nucleótidos. Cuentan con 30% de adenina, 24% de citosina, 22.5% de guanina y 23.5% de uracilo. Su extremo 3' es poliadenilado y 5' tiene unido covalentemente un oligopéptido codificado por el virus denominado VPg (virión protein genoma). El genoma es monocistrónico y muestra en ambos extremos de la cadena zonas no codificadas llamadas NTR. En el centro se encuentra la zona codificadora que porta 11 genes que originan una proteína de 247 kd para después ser escindida por 3 proteasas virales (2A,3C,3CD). Los principales epítomos usados para la formación de anticuerpos en el cuerpo humano se encuentran en regiones VP1-VP3. Dentro de los diferentes serotipos se encuentran 3 especies: RV-A (80 serotipos), RV-B(32 serotipos) y RV-C(55 serotipos), estas clasificaciones se realizan dependiendo de la secuencia de nucleótidos. Los serotipos A y B han sido clasificados en grupos mayores y menores basados en su especificidad para el receptor celular. Los serotipos que utilizan el receptor de adhesión intercelular (ICAM-1) los cuales son 68 del RV-A y todos los de RV-B representan la mayoría o el grupo mayor.. Los restantes serotipos de RV-A tienen como receptor a LDL representando el grupo menor. Los serotipos RV-C se unen a CDHR3 que es un miembro de la familia de las caderinas (23).

ICAM-1 se encuentra en células del epitelio respiratorio así como en macrófagos y células dendríticas. Aunque el virus no puede infectar a las células del sistema inmune esta adherencia por ICAM-1 hace a las células menos efectivas para reportar la infección a las células requeridas para generar anticuerpos de memoria. ICAM-1 se une a las proteínas de la cápside del virus (VP-1, VP-2 y VP-3). El evento inicial de la replicación es la adsorción del virión en los sitios receptores de la membrana plasmática de las

células la cual es influenciada por el bajo pH y dependiente de los iones de calcio y magnesio. Después de la adsorción el virus penetra por mecanismos poco conocidos para desnudar y liberar el ARN dentro del citoplasma donde ocurre el proceso replicativo. Usando ribosomas y otras proteínas de la maquinaria celular, el ARN viral(ARNm), forma poliribosomas para la síntesis directa de una poliproteína que es posteriormente cortada formando 10s precursores proteicos P1, P2 y P3. Los siguientes cortes son autocatalíticos y dan lugar a 3 proteínas más pequeñas que son: la proteinasa 3C (necesaria para el corte de proteínas virales), la proteína 3AB, precursora de VPg y probablemente necesaria para la síntesis de ARN y una ARN polimerasa (3D) requerida para la copia del ARN. El ARN servirá de molde para la traducción. Como paso preliminar en el ensamblaje, el precursor de cubierta P1 es cortado por proteinasas virales para formar una subunidad 5s (promotor inmaduro) compuesta por tres agregados proteicos (VPO, VP3 y VP1). La subunidad 5s forma pentámeros, 12 de los cuales son requeridos para formar las 60 subunidades proteicas de la envoltura. La formación de virus infectivos es acompañada de cortes de maduración de VPO (en VP4 y VP2), catalizado por la propia VPO en unión con el ARN viral, para quedar las 4 subunidades características de los picomavirus.

El período de eclipse, también llamado período latente o de laguna, dura típicamente de 2 a 4 h, y se puede disminuir por el aumento de la multiplicidad de infección.

Terminado el proceso de maduración las partículas virales completas cuentan con 60 copias de cada proteína capsídica, una copia del genoma ARN y una copia de VPg; estas frecuentemente forman cristales en el citoplasma y son finalmente expulsadas al exterior por la lisis de la célula infectada. El tiempo requerido para un ciclo de multiplicación completo es de 5 a 10 h, dependiendo de variables como el pH, la temperatura, el virus, la célula hospedera, el vigor nutricional de la misma y el número de partículas que la infectan. Bajo condiciones favorables son expulsadas de 25,000 a 100,000 partículas virales por célula (24). No existe una vacuna contra este virus ya que existe poca o ninguna protección cruzada entre sus epítomos.

Virus Sincitial Respiratorio (RSV)

El virus sincitial respiratorio fue descubierto en 1956 en un grupo de chimpancés a las afueras de Washington D.C por Morris y colaboradores. Observaron que los animales desarrollaban una especie de resfriado con coriza y lo nombraron inicialmente CCA(Chimpnzee coryza agent). Posteriormente fue nombrado Virus Sincitial Respiratorio debido a que la palabra “sincitial” procede de dos términos griegos: el adverbio “syn” que significa “con” y transmite la idea de “fusión”, y el sustantivo “cytos” que significa “célula”. Así queda descrita la principal lesión anatomo- patológica que produce este virus: al destruir las membranas celulares en los puntos de contacto de unas células con otras se forman grandes masas protoplasmáticas que contienen los numerosos núcleos celulares que pertenecían a las células intactas: son los llamados “sincitios”. Este virus es el principal agente relacionado con las enfermedades respiratorias en pacientes lactantes y se ha demostrado que también se relaciona de una menor manera con las IRA en pacientes adultos, y estas últimas con un estado clínico grave por lo general. La distribución de este virus es mundial y por lo general las infecciones ocurren en meses de invierno y lluvia (25). Existen dos subtipos, A y B. El RSV se clasifica o pertenece a la familia de Paramyxoviridae. Su genoma está conformado por ARN monocatenario o de cadena simple con polaridad negativa y de aproximadamente 15,2kb los cuales codifican para 10 ARNm Las partículas virales están constituidas por una nucleocápside helicoidal cubierta por una envoltura la cual es lipoproteica y esta se adquiere al momento de que el virus sale de la célula infectada por el mecanismo de gemación. Dentro de sus proteínas se encuentran las proteínas virales: glicoproteína G, la glicoproteína F y la proteína SH, M2, N, P, L y M así como proteínas no estructurales NS1 y NS2. . La glicoproteína G se relaciona con la unión al receptor y es la proteína principal de la nucleocápside. La glicoproteína F es la proteína de fusión y es un factor crítico en la infección y patogenia e induce la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedera provocando al formación de sincitios antes mencionados permitiendo así la propagación directa del virus. La proteína SH tiene características hidrofóbicas y se acumula en células infectadas y participa junto con la proteína F y G en la formación de sincitios y en el

bloqueo de la apoptosis para la supervivencia de la célula infectada.. Además de estas proteínas se encuentra también la proteína M la cual forma una cubierta proteica en la cara interna de la envoltura. Estas glicoproteínas se organizan en forma de protuberancias en la envoltura las cuales miden aproximadamente 11-20nm y se encuentran separadas entre sí por aproximadamente 6-10nm. La nucleocápside es una hélice simétrica que contiene el ARN viral la cual está asociada con la nucleoproteína llamada N antes mencionada , con una ARN polimerasa llamada L, la cual junto con las proteínas P y N forma el complejo polimerasa , una fosfoproteína P la cual es parte del complejo de polimerasa y un factor anti terminador de la transcripción llamado M2. Las proteínas no estructurales son denominadas NS1 y NS2 y se les denominan así debido a que no son encontradas en los viriones maduros como las antes mencionadas y se les relaciona con la disminución de la expresión de interferones tipo 1 en la respuesta antiviral (26).

Las manifestaciones clínicas durante la infección varía de acuerdo a la edad del paciente y como se comentó afecta principalmente a lactantes. Las principales manifestaciones o entidades clínicas son la bronquiolitis y la neumonía en este tipo de población. La enfermedad comienza con rinorrea acompañada de disminución del apetito y puede originarse fiebre y coriza. Días más tarde comienza la tos y las sibilancias y estas progresan hasta presentar disnea con signos de esfuerzos respiratorios como tiraje intercostal y aleteo nasal junto con taquipnea. Este tipo de infecciones son aún más peligrosas en aquellos pacientes con displasia broncopulmonar o enfermedades congénitas cardíacas y se ha demostrado que tener el antecedente de una IRA previa hace que la infección con RSV en el lactante curse de una manera más agresiva con un comportamiento clínico grave y hospitalización del paciente (27). El VRS es marcadamente contagioso y se transmite por contacto con secreciones respiratorias, principalmente por contaminación de las manos y la subsiguiente inoculación de la mucosa nasal y conjuntiva. El período de incubación es de 4 a 5 días y la excreción viral puede persistir desde una hasta tres semanas.

La infección se inicia por multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior y se propaga hacia el aparato respiratorio inferior después de 1 a 3 días, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas, aunque puede

extenderse de célula a célula mediante la fusión de sus membranas (sincitios antes mencionados), provocando infecciones respiratorias agudas las cuales si no son controladas adecuadamente progresan a bronquiolitis y neumonía.

Desde sus inicios, los tratamientos contra el VSRH presentaron características profilácticas. Estos tratamientos comprenden péptidos sintéticos, antígenos virales recombinantes, anticuerpos policlonales y monoclonales humanizados, entre otros. El más empleado actualmente es el AcM humanizado, palivizumab, ya que se ha obtenido con él una disminución en la hospitalización de los hospederos más susceptibles (28).

Metaneumovirus Humano (hMPV)

Este virus respiratorio tiene pocos años de haber sido descubierto en comparación con el rinovirus y el RSV, su descubrimiento fue realizado en Holanda por Van den Hoogen y colaboradores en el año 2001. Perteneció a la familia de Paramyxoviridae al igual que el RSV. Existen por lo menos 2 especies de hMPV el A y el B. Este virus posee una hebra simple de RNA negativa no segmentada carece de genes codificadores de proteínas NS1 y NS2. El genoma asociado a las proteínas N (nucleoproteína), P (fosfoproteína) y L (large) conforma la nucleocápsula helicoidal, envuelta por un manto constituido por una bicapa lipídica de la membrana plasmática de la célula huésped, en la cual se insertan 3 glicoproteínas: adhesión (G), fusión (F) e hidrofóbica pequeña (SH). Las dos primeras constituyen las espículas en la superficie del virión y participan en la formación de sincitios. En la cara interna de la membrana las glicoproteínas interactúan con la proteína de la matriz (M). La proteína L se considera RNA-polimerasa viral y requiere para funcionar de la presencia de la proteína N y P (29). Tiene una distribución temporal similar a la del RSV presentándose en invierno. La infección por este virus tiene un período de incubación de 5-6 días, se transmite a través de aerosoles respiratorios al igual que los virus antes mencionados(30). Las manifestaciones clínicas durante esta infección presentan signos y síntomas tanto de vía respiratoria alta como de baja o inferior. Esto incluye cuadros como bronquiolitis, bronquitis y neumonía. Es menos frecuente la presentación con laringitis. Los pacientes presentan fiebre, tos y disnea acompañada con sibilancias, estas debidas a la inflamación del árbol traqueo bronquial y

el atrapamiento aéreo con atelectasias las cuales se pueden demostrar mediante radiografías de tórax. No existe tratamiento o vacuna específica para esta infección viral, únicamente las medidas de soporte de oxígeno y el manejo sintomático así como aspirado de secreciones bronquiales (31).

Respuesta inmune antiviral

Se le conoce como respuesta inmune a la actuación integrada de un gran número de mecanismos heterogéneos de defensa contra sustancias y agentes extraños, por ejemplo los virus, las bacterias, los hongos y parásitos, aunque puede ser cualquier agente no reconocido por el sistema inmune incluso partículas propias. La respuesta inmune incluye una gran diversidad de procesos biológicos en el interior del organismo lo cual permite mantener la homeostasis del cuerpo frente a estas agresiones ya sean externas o internas (32). Se deben de tomar en cuenta que existen diversos factores del mismo hospedero la edad, sexo, genética, el estado nutricional los cuales afectan esta respuesta inmune y son importante en el desarrollo de la enfermedad como en la inmunopatogénesis. El agente infeccioso viral ingresa a las células mediante receptores celulares como ICAM-1 en el caso de rinovirus, CXCR1 para el RSV e integrinas para el hMPV((33-35)). Las células del cuerpo contienen mecanismos para detectar patógenos por una serie de receptores los cuales se denominan Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) estos pertenecen al sistema inmune innato y se encargan de reconocer los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Los PRRs importantes en el reconocimiento de virus se encuentran los Receptores tipo Toll (TLR), la familia de genes indicios por ácido retinoico I (RIG-1), los receptores tipo NOD (NLRs) entre otros . (36).

TLRs

TLR3 es de suma importancia en la respuesta inmune antiviral y se encuentra en los endosomas de las células dendríticas y de los linfocitos B y se encarga de reconocer el ARN de doble cadena que se encuentra en los virus y es importante mencionar que su dominio TIR se une a la molécula adaptadora TRIF. El receptor TLR7 al igual que TLR3 es sumamente importante en la respuesta inmune antiviral debido a que se encarga

de reconocer el ARN de cadena sencilla de los virus y al igual que su semejante este se localiza en los endosomas de los linfocitos B, monocitos y macrófagos así como células dendríticas, su dominio TIR se une a la molécula MyD88. TLR8 se encarga de reconocer RNA de cadena sencilla también proveniente de los agentes virales teniendo una fuerte participación en la respuesta inmune antiviral, este se encuentra en los endosomas de los monocitos, macrófagos y células dendríticas y su dominio TIR se une a MYD88. Debido a que este trabajo se enfoca en la respuesta antiviral se describirá a continuación la cascada de señalización involucrada en TLR3, TLR7 y TLR8. En el caso de TLR3 localizado en el endosoma reconociendo RNA de doble cadena este en su dominio TIR recluta a la molécula adaptadora TRIF la cual inicia la cascada de señalización al reclutar a una proteína llamada RIP1. Esto puede tomar 2 caminos, uno de ellos mediante las moléculas TRAF 3 los cuales generan la estimulación de las quinasas IKK, TBK1 y/o IKKe en un complejo de quinasas que también contienen a IKK γ y TANK llevando así a la fosforilación y activación de los factores reguladores de interferón 3 Y 7 (IRF3 e IRF7) con la subsecuente inducción de la producción de interferones tipo I y tipo III. Estos son la base de una buena respuesta inmune antiviral (más adelante en esta sección se hablara de ellos más detalladamente). El otro camino es por medio de TRAF6 la cual ocasiona que la quinasa TAK1 estimule al complejo de quinasas IKKy, IKKa e IKKb. Este complejo de quinasas se encargara de fosforilar a Ikb el cual se encuentra inhibiendo a los factores de transcripción p65 y p50. Una vez fosforilada estas dos factores podrán traslocarse al núcleo y junto con IRF3 e IRF7 estimular la producción de IFN tipo I y tipo III. Para el caso de los TLR7 y TLR8 los cuales reconocen RNA de cadena sencilla se utilizará la proteína adaptadora MYD88 (a diferencia de TLR3 quien utiliza TRIF) para después activar un complejo de proteínas llamado IRAK que contiene a IRAK4 e IRAK1. Aquí la cascada de señalización puede seguir dos caminos, por medio de la molécula TRAF6 quien estimulara a TAK1 quinasa y se seguirá la misma vía que TLR3 para estimular la producción de IFN tipo I y tipo III por medio de los factores de transcripción p65 y p50. El otro camino es mediante la molécula TRAF3 quien estimula a la quinasa IKKa para que esta fosforile a IRF7 y pueda traslocarse al núcleo y así estimular la producción de IFN tipo I y tipo III (37). Es importante comentar que a pesar de que TLR3 reconoce RNA de cadena doble este es

capaz de montar una respuesta inmune contra los virus de RNA de cadena sencilla debido a que durante el ciclo de replicación viral llega a formarse una doble hebra de RNA el cual puede ser reconocido (38).

RLRs

Los receptores tipo RIG-1 o RLRs también actúan como sensores para la replicación viral. Existen 3 RLRs , RIG-1, MDA5 y LGP2. RIG-1 se une con mayor afinidad a RNA de doble cadena de una longitud corta (menos de 300 pares de bases) y con una característica especial la cual es que este trifosforilado en su extremo 5', mientras que MDA5 se une a RNA de doble cadena con una longitud mayor (mayor de 1000 pares de bases) sin especificidad por la terminación. LGP2 se ha demostrado que también tiene afinidad por el ARN sin embargo aún no se dilucida su función durante las infecciones y se cree que tiene un función inhibitoria. La estructura básica de estos receptores consiste en un dominio CARD (de reclutamiento de caspasas) una ATPasa que contiene una helicasa DEAD y un dominio C terminal. LGP2 carece de dominio CARD (39). Tanto RIG-1 como MDA5 al momento en que detecten este RNA viral activan a su proteína adaptadora llamada IPS-1 la cual estimulara a un complejo de proteínas conformado por TRAF3, TANK y NAP1, estas estimularán a las quinasas TBK1, IKKe y a la proteína DDX3 las cuales fosforilarán a IRF3 y a IRF7 para poder que se transloquen al núcleo celular y estimular la producción de IFN tipo I y tipo III (40).

NLRs

Los receptores tipo NOD o NLR están agrupados en una familia que contiene 22 miembros proteicos, su estructura básica contiene un dominio de reconocimiento de leucina, un dominio central de oligomerización llamado NOD y un dominio de señalización el cual contiene el dominio CARD que se encarga del reclutamiento de caspasas, purinas así como dominios que se encargan de inhibir la apoptosis. Su señalización al momento de la activación de estos receptores ocasiona que los dominios NOD se unen a una proteína cinasa a través de su dominio CARD llamada RIP2, esta recluta a un grupo de proteínas (IKK, TAB1/2 y TAK1) las cuales forman un complejo proteico llamado MAKK quien fosforila a la quinasa JN (JNK) y a P38. Estos últimos se

encargarán de trasladarse al núcleo celular para ocasionar la expresión de genes a través de los factores de transcripción NF κ B y AP-1. Esta señalización promoverá así la producción de citocinas pro inflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-4, IL-12, IL-18, IL-18. Esta vía de señalización también participa en la secreción de IL-1 β por un mecanismo dependiente de caspasa así como en la formación del inflamasoma (una inflamación estéril)(41).

Interferones (IFN)

Los interferones (IFN) son la principal línea de ataque en contra de una infección viral. Estos fueron descubiertos en el año de 1957 cuando Isaacs y Lindenmann describieron una serie de moléculas que eran producidas en las células tras la infección con el virus de la influenza. Estos son un grupo de proteínas de señalización son producidas y secretadas por la célula del huésped en respuesta a una infección viral en este caso. Estos interferones son parte de una gran familia proteica llamada citocinas. Estos son nombrados interferones debido a su capacidad para interferir con la replicación viral (42). Se han identificado más de 20 genes y proteínas de IFN en humanos, normalmente se dividen en 3 categorías: IFN tipo I, IFN tipos II e IFN tipo III. Los interferones tipo I presentes en humanos son IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω , estos son producidos por los fibroblastos y los monocitos. Una vez liberados se unen a un complejo receptor en la superficie celular de la mayoría de las células, este receptor se denomina IFNAR conformado por IFNAR1 y IFNAR2. El interferón tipo II es conocido también como IFN- γ este es activado por IL-12. Este tipo de interferones son liberados por las células T helper tipo 1. Su receptor es llamado IFNGR el cual se conforma de IFNGR1 y IFNGR2. Los interferones tipo III son denominados IL-28A/IFN- λ 1, IL-28B/IFN- λ 2, and IL-29/IFN- λ 3. Estos son producidos por todos los tipos celulares sin embargo su receptor IFNLR1 forma un complejo con una proteína llamada IL10R. Este complejo receptor únicamente se encuentra en los hepatocitos y en las células epiteliales (43). Debido a que en nuestro trabajo solamente nos enfocamos en los IFN tipo I y los tipo III se describirá brevemente a continuación la vía de señalización de estos. Ambos tipos de IFN (I y III) poseen la misma vía de señalización,

la única diferencia es el receptor ya antes mencionado. Una vez activado el receptor esto señalizan por la vía JAK-STAT para así estimular a los ISRE (elemento de respuesta estimulado por interferón), lo cual originará una serie de proteína (más de 300) con efectos antivirales tanto autocrinos como paracrinos. Algunos ejemplos de estas proteínas son las OAS, MXA, IFIT1/2, PKR ISG15 CH25H, Viperina entre otras. Estas proteínas afectaran las diferentes etapas de la replicación viral como por ejemplo las proteínas OAS mxA y PKR afectan en la entrada, el desnudamiento, la transcripción del RNAm viral así como la traducción de este y la replicación mientras que las proteínas Viperina e ISG15 afectan en la envoltura del virión así como en la replicación y liberación de estos, controlando así la infección viral (44). Esta respuesta inmune cabe mencionar que puede ser burlada en ocasiones por mecanismos de evasión viral causando así el establecimiento de una infección en el hospedero. La capacidad viral de variar antigénicamente es uno de los mecanismos de evasión más importante usado por una gran cantidad de virus. Estos en ocasiones son debido a errores cometidos por la transcriptasa viral que puede llegar a cambiar de un 10 -30% de las regiones hipervariables. Otro mecanismo es debido a mutaciones puntuales que presentan los virus originando así un cambio antigénico que ocasiona un reordenamiento de segmentos enteros de RNA viral que producen un nuevo agente viral para el cual la población o el hospedero no tiene inmunidad ocasionando pandemias o epidemias (45). Dentro de esta respuesta inmune antiviral se encuentran también un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por una gran variedad de tipos celulares, las cuales actúan principalmente como reguladores de esta respuesta inmune. Este grupo proteico se denominan Citocinas y fueron descubriéndose aproximadamente hace 50 años con el descubrimiento por parte de Isaac y Lindermann de la actividad del interferón. Años más tarde durante años sesenta se evidenció la presencia de diferentes actividades biológicas en el sobrenadante de cultivos celulares. Así fue como los factores estimuladores de colonias (CSF) fueron descubiertos por Robinson y colaboradores, estos fueron llamados así debido a su capacidad de estimular la formación de granulocitos y macrófagos en la médula ósea. Más adelante, en 1969, el grupo de Dumonde designó con el nombre de linfocina una serie de mediadores de la inmunidad celular producidos por los linfocitos. En los años siguientes se caracterizaron diversas linfocinas, así como otros mediadores

producidos por los monocitos que fueron denominados monocinas. En 1974 el grupo de Cohen propuso utilizar el nombre de citocinas para referirse en general a esta cada vez más amplia serie de mediadores celulares originados en muy diversos tipos celulares. Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN) antes mencionados, los CSF y las quimocinas (46). Las citocinas forman una compleja red de diversas interacciones las cuales conectan distintos tipos celulares, estas citocinas pueden inducir o suprimir su propia síntesis o la de otras citocinas así como tener un efecto sinérgico con otras o incluso llegar a estimular o suprimir la expresión de sus receptores en las diversas células, esto debido a que poseen un efecto autocrino, paracrino, yuxtacrino y retrocrino. La actuación de las citocinas es debido a su interacción con sus diversos receptores de membrana celulares desencadenando así una cascada bioquímica que culmina en la función de cada una de las diversas citocinas. Estas moléculas proteicas tienen un efecto redundante garantizando así la homeostasis del cuerpo humano y actúan como reguladores sistémicos a concentraciones de nano o pico moles, modulando la actividad de un amplio espectro de tipos celulares que, en general, es bastante superior al de las hormonas. El epitelio respiratorio en respuesta a la infección viral secreta una gran variedad de citocinas para poder así intentar mantener la homeostasis y evitar la enfermedad. Entre las citocinas asociadas a la respuesta antiviral se encuentran los interferones, así como la interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) (47), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factores estimuladoras de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). IL6 es especialmente importante debido a que esta ayuda a la transición de la respuesta inmune innata a la adaptativa promoviendo la diferenciación de monocitos y células T, altos niveles se asocian o correlaciones con la gravedad de la enfermedad y si deficiencia puede ocasionar una replicación viral descontrolada resultando en una mortalidad elevada (48) (49). Otras citocinas como el TNF- α se asocian con una mayor morbilidad si sus niveles están elevados mientras que los factores de crecimiento como GM-CSF ayudan al reclutamiento de células dendríticas en tejido respiratorio como de macrófagos en dicho tejido (43). Interleucina 8 se ha asociado a síndromes respiratorios como complicaciones a infecciones virales (50). Se ha descrito una red de citocinas implicadas en la respuesta tanto celular como humoral, la IL-1

liberada por las células epiteliales infectadas causan una estimulación de una respuesta Th17 lo que lleva la producción de IL-17 y a si al reclutamiento de los neutrófilos. En esta estimulación neutrofílica también participan la IL-6 y TGF-B. Incluso la linfopoyetina estromal timica se ha asociado al reclutamiento y maduración de las células detriticas en epitelio respiratorio ocasionando la activación de celular T para poder tomar el camino de la respuesta Th2 secretando IL-4 e IL-13 y provocando inflamación en el musculo liso y al mismo tiempo activando a las células B para la producción de anticuerpos. Este camino también puede llevar a la producción de IL-5 por parte de las células Th2 y estimular a los eosinófilos. La célula T activada por la célula dendrítica puede tomar el camino de Th17 mediante la producción de IL-6 e IL-23 activando así a los neutrófilos. Se ha asociado también que las células epiteliales pueden participar en la producción de IL-25 e IL-33 lo cual lleva a la estimulación de los linfocitos innatos tipo 2 (ILC2) y la posterior producción y liberación de IL-5 e IL-13 por los mismos (51). Aunque se conocen las bases de esta respuesta inmune es necesario generar mucha más información para poder dilucidar específicamente la respuesta inmune antiviral para cada virus en específico y poder generar nuevos métodos diagnósticos así como nuevas terapias para este tipo de infecciones con una gran elevada morbimortalidad.

Monoinfección Vs Co-infección

El agente etiológico de las IRA no siempre es conocido, los pacientes con infecciones respiratorias habitualmente son seguidos de forma ambulatoria, sin estudio de la etiología de la misma y cuando son hospitalizados, las técnicas de estudio que se utilizan habitualmente carecen de sensibilidad adecuada. Sin embargo durante los últimos años el estudio y la detección del/los agente/s etiológico/s durante las infecciones se ha convertido en una tendencia desde la aparición de las distintas pruebas moleculares para su análisis. Estas técnicas moleculares por lo general solamente se utilizan en estudios de investigación y no para diagnósticos de rutina debido al elevado costo que presentan. Las infecciones virales respiratorias pueden presentarse de dos maneras hablando específicamente del agente etiológico: a) monoinfección siendo solo un agente el causante de la enfermedad; o b) co-infección siendo mas de un agente el causante por lo

general virales, bacterianos o comúnmente ambos. Se ha reportado que el número de co-infecciones detectadas ha ido en aumento durante los últimos años aproximadamente en un 50%. En muchas ocasiones el manejo clínico de los pacientes hace sospechar el tipo de virus que causa la IRA (bronquiolitis asociada con la infección con RSV), sin embargo en muchas más ocasiones la presentación clínica no se determina por el tipo de virus infectante y pacientes infectados por un virus específicamente no tienen un patrón clínico distinguible con aquellos que presentan varios agentes etiológicos de la IRA (52). Esto genera en la actualidad una gran discusión acerca de la relación o la importancia que existe entre una Monoinfección o co-infección con la patogénesis y gravedad clínica de los pacientes y la evolución de la enfermedad, mientras que algunos autores reportan que entre más agentes virales causen la IRA más grave es la enfermedad cursando de una manera más agresiva y requiriendo hospitalización de los pacientes (53), otros investigadores reportan que en sus hallazgos no encontraron relación alguna entre estas variables (54). Durante una IRA con una co-infección bacteriana se ha demostrado que la gravedad clínica de los paciente si es afectada, presentando una sintomatología mas grave que aquellos que solo tienen una monoinfección o co-infección viral (55).

ANTECEDENTES

Antecedentes

El rol y la importancia de los IFNs durante la respuesta antiviral se ha evaluado en diferentes tipos de estudios durante varios años. Muchas de las investigaciones se han realizado principalmente en cultivo celular y en modelo animal, tal es el caso del rinovirus humano en el cual mediante cultivos celulares se ha encontrado un aumento en los niveles de interferones tipo III específicamente el de $\lambda 1$, haciendo constar que estos están involucrados en la patogénesis de la infección por este virus incluso se describe que el tratamiento de cultivos celulares con este tipo de IFNs ocasiona incluso una disminución de la carga viral del rinovirus (56), sin embargo se debe tomar en cuenta que la carga viral no siempre esta asociada con el estado de la infección ni con la gravedad de esta. El rol de los IFNs durante la infección por rinovirus aún no es del todo comprendido e incluso se creía que los IFNs tipo I disminuían durante la infección (57), provocando una menor respuesta antiviral. Incluso este virus ha sido asociado con exacerbaciones asmáticas y se cree que los IFNs juegan un rol importante en la respuesta inflamatoria que causa la agudización de esta enfermedad crónica (58). El virus sincitial respiratorio es uno de los agentes los cuales ha causado una gran morbilidad principalmente en pacientes pediátricos, por lo que es uno de los virus con mayores áreas de estudio, y a diferencia del rinovirus muchos de los estudios en este caso abarcan pacientes pediátricos, sin embargo estos estudios son clínicos y principalmente han sido para el estudio de la bronquiolitis (59). Uno de los principales hallazgos en cultivos celulares fue que durante la infección por este virus los IFNs tipo I como los tipos III se encuentran elevados en comparación con los controles y estos participan activamente para la resolución de la misma, también se describe que a pesar de que ambos tipos de IFNs están expresándose los IFNs tipo III son los que tienen una mayor concentración y por lo tanto un mayor efecto antiviral durante la infección (60). Un efecto similar también ha sido demostrado en experimentos con modelos animales en los cuales ratones infectados con el virus de influenza produjeron mayores concentraciones de IFNs tipo III comparados con los de tipo I. La razón del porque este virus afecte de una manera mas frecuente a los lactantes no esta bien establecido aún, sin embargo se cree que concentraciones bajas de los IFNs específicamente los tipo I en las células dendríticas plasmacitoides sea un factor que hace mas propensos a esta población en

especifico a la infección (61). Al no existir un tratamiento específico para este tipo de infección se ha optado por el uso de medicamentos antivirales, sin embargo se ha demostrado que en el caso de el RSV este tipo de tratamiento puede disminuir la acción de los IFNs tipo III haciendo mas susceptible al paciente a presentar complicaciones asociadas (62). El metaneumovirus humano no puede distinguirse clínicamente del RSV ya que también se ha asociado a el mismo cuadro clínico y complicaciones y esa es una de las razones por lo que muchas de las ocasiones se les asocia en un mismo estudio, incluso se ha demostrado que este virus promueve una respuesta antiviral muy similar a la del RSV (63) Existe una menor cantidad de estudios los cuales describan el efecto de los IFNs ante la mono infección con el hMPV y la mayoría de estos son modelos animales y cultivos celulares siendo la minoría el estudio con modelos humanos. , Esto debido a que es un virus de reciente descubrimiento (2001), sin embargo existen reportes en modelos in vitro los los cuales indican que la infección por este virus es resistente a los IFNs tipo I (64) y que los interferones tipo III participan de una manera mas activa con una mayor concentración durante la infección, teniendo así un papel fundamental para la resolución de la misma (65, 66). La mayoría de los estudios que se encuentran hoy en día son en cultivos celulares o modelos animales y pocos se realizan en modelos humanos y a pesar de esto la mayoría se enfoca en las vías respiratorias inferiores por lo que nuestro estudio aporta información necesaria para una mayor comprensión de la fisiopatología de estas infecciones.

A la fecha existe poca información de los niveles de IFNs en mucosa nasal en pacientes mono infectados con rinovirus, virus Sincitial respiratorio y Metaneumovirus.

JUSTIFICACIÓN

Justificación

Las IRA's son un problema de salud mundial debido a la gran morbilidad y mortalidad que causan. A la fecha existe poca evidencia de la respuesta inmune de infecciones respiratorias virales en mucosa de tracto respiratorio superior. Por lo tanto es necesario dilucidar el microambiente de interferones tipo I y III en mucosa nasal de pacientes **MONOINFECTADOS** por Rinovirus, Virus Sincitial Respiratorio y Metaneumovirus.

OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo general

Determinar los niveles de interferones tipo I y III en mucosa nasal de pacientes MONOINFECTADOS por Rinovirus, Virus Sincitial Respiratorio y Metaneumovirus.

Objetivos específicos

1. Identificar el agente viral asociado a la infección respiratoria aguda.
2. Determinar los niveles de Interferones tipo I y III en mucosa nasal en pacientes infectados con virus respiratorios.
3. Relacionar las variables estudiadas con el estado clínico del paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y métodos

Estrategia general y selección de los pacientes

Los pacientes pediátricos se colaboró con el servicio de Pediatría del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La selección de los pacientes adultos se realizó de un estudio previo en la Tesis de Erick Arredondo Loza cuyos pacientes fueron reclutados en las instalaciones de Servicios Médicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios para la selección de los pacientes.

Pediátricos

Criterios de inclusión:

1. Pacientes menores de 18 años de edad no importando género.
2. Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.

Criterios de exclusión:

1. Paciente trasladado de otro hospital en el que hubiera estado internado por más de 48 horas.
2. Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa.
3. Episodio de infección respiratoria aguda en los últimos 30 días.
4. Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa.
5. Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia.
6. Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH.
7. Uso de esteroides de manera crónica

Criterios de eliminación:

1. Baja cantidad de muestra.
2. Mala calidad de la muestra.

Adultos

Criterios de inclusión:

1. Pacientes mayores de 18 años de edad no importando género.
2. Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.

Criterios de exclusión:

1. Paciente trasladado de otro hospital en el que hubiera estado internado por más de 48 horas.
2. Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa.
3. Episodio de infección respiratoria aguda en los últimos 30 días.
4. Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa.
5. Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia.
6. Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH.
7. Uso de esteroides de manera crónica.
8. Mujeres embarazadas

Criterios de eliminación:

1. Baja cantidad de muestra.
2. Mala calidad de la muestra.

Es importante mencionar que se incluyeron 9 controles adultos así como 5 controles pediátricos de los cuales se darán las características en la sección de resultados.

Obtención de las muestras

El enrolamiento de los pacientes pediátricos se realizó en el Departamento de Pediatría del Hospital Universitario. Se procedió a realizar una encuesta para obtener datos de la historia clínica de los pacientes así como datos sociodemográficos de los mismos. Se realizó la toma de exudado faríngeo a los pacientes mediante el uso de un hisopo medico apoyándose con un abate lenguas para poder tener una mejor vista de la faringe en su pared posterior, para después pasar a almacenar los hisopos en medio de transporte viral.

Además de la toma del exudado faríngeo se procedió también a tomar una muestra de lavado nasal en los pacientes, esto posicionando la cabeza de los mismos en una posición decúbito lateral para facilitar la toma de muestra. Se emplearon pipetas Pasteur de plástico con solución fisiológica a temperatura ambiente para realizar los lavados nasales para posteriormente colocarlos en crio tubos y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Identificación de los agentes virales

Extracción de ácidos nucleicos (estuche QIAamp MinElute Virus Spin)

En tubos de polipropileno de 1.5 mL se añadió 25 µL de proteasa, 200 µL de muestra (transporte viral) y 200 µL de acarreador de ARN-AVL previamente preparado. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos e incubó en placa caliente (56 °C) durante 15 minutos y se centrifugó. Posteriormente, se adicionó 250 µL de etanol absoluto grado biología molecular, se agito vigorosamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El volumen total se adicionó a columnas “QIAamp MinElute”, las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g, se descartó el tubo colector . La columna se colocó en uno nuevo para adicionar 500 µL de solución amortiguadora “AW1”. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g, se descartó el tubo colector y se colocó la columna en uno nuevo para adicionar 500 µL de solución amortiguadora “AW2”. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g. El tubo colector fue descartado y se colocó la columna en uno nuevo, se adicionó 500 µL de etanol absoluto grado biología molecular y las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 6,000 x g. El tubo colector fue descartado y se colocó la columna en uno nuevo y centrifugó durante 3 minutos a 20,000 x g. La columna fue incubada a 56 °C durante 3 minutos, posteriormente, el tubo colector fue descartado y la

columna fue colocada en un tubo de polipropileno de 1.5 mL. Se adicionó 50 µL de solución amortiguadora “AVE” directamente en la membrana e incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 20,000 x g durante 1 minuto. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en congelación (-80 °C) hasta su uso.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras fueron cuantificadas empleando un NanoDrop 200. El equipo se ajustó con un blanco para análisis a una absorbancia de 280/260 nm y con el factor para ARN. Posteriormente, las muestras fueron analizadas y las concentraciones y purezas fueron registradas.

xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 (Luminex)

Para la mezcla maestra (MM) se llevó a cabo la adición de 1.3 µL de agua libre de ARNasas, 4 µL de solución amortiguadora “OneStep” 5x, 1.1 µL de mezcla de nucleótidos xTAG®, 2 µL de cebadores xTAG®, 1.6 µL de mezcla de enzimas “OneStep”. Luego se agregó 10 µL de MM a cada uno de los tubos previamente etiquetados y 10 µL de ácidos nucleicos extraídos. Se realizaron controles con ADN lambda o agua libre de ARNasas. Los tubos fueron agitados durante 2-5 segundos y se bajó el líquido al fondo usando una minicentrífuga. Los tubos fueron colocados en el termociclador precalentado (50 °C) y la RT-qPCR multiplex se llevó a cabo siguiendo las condiciones mencionadas en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex para detección de agentes virales utilizando el kit xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2.

Paso		Tiempo	Temperatura (°C)
1	Precalentado	20 min	50
2	Activación de polimerasa	15 min	95
3	Desnaturalización	30 s	95
4	Alineamiento	30 s	59
5	Extensión	30 s	72
6	Ir al paso 3 x 35 veces		
7		2 min	72
8		Infinito	4

La hibridación se llevó a cabo en una microplaca para PCR adicionando 20 µL de microesferas, 2 µL del producto de RT-PCR y 75 µL de SA-PE diluido en solución amortiguadora informante a cada uno de los pocillos. Se mezclaron suavemente por pipeteo y se colocaron en el termociclador previamente precalentado (45 °C) y programado 20 minutos a 45 °C. La adquisición de datos se llevó a cabo en el Bioplex 200 (Biorad) empleando el software xPONENT.

Cuantificación de los agentes virales

Este procedimiento aplica para Metaneumovirus humano, Rinovirus y VSR. Las reacciones de cuantificación se llevaron a cabo adicionando, a tubos de PCR, 5 μ L de 2x “QuantiNova Probe qRT-PCR de Qiagen”, 0.1 μ L de “QN Probe RT mix”, 0.5 μ L de 20x mezcla de cebadores/sonda, 1.9 μ L de agua libre de ARNasas y 2.5 μ L de la muestra, control positivo o sin templado (curva estándar o agua libre de ARNasas, respectivamente). El termociclador CFX-96 (Bio-Rad) fue configurado como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para cargas virales utilizando estuches de Genesig y QuantiNova.

Paso		Tiempo	Temperatura (°C)
1	RT	10	45
2	Activación de polimerasa	5	95
3	Desnaturalización	10	95
4	Alineamiento/extensión	30	60
5	Ir al paso 3 x 49		

Una vez terminada la reacción se determinó el umbral de amplificación y se obtuvo la concentración de las muestras problemas con la ecuación obtenida de la curva de calibración.

Detección de *Streptococcus pneumoniae*

Las muestras fueron analizadas para descartar la presencia de *Streptococcus pneumoniae* por PCR Tiempo Real las reacciones se realizaron con iQ-Supremix (BIO-RAD) empleando primers y sondas Taqman, previamente reportadas (forward S-pneu: ACGCAATCTAGCAGATGAAGC; reverse S-pneu: TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC; y sonda: 6FAMTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGTAMRA)(67). Las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 (BIO-RAD) con las siguientes condiciones:

- 1) 95 ° C durante 10 min
- 2) 49 ciclos de 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min y 72 ° C durante 1 min.
- 3) 72 ° C durante 5 min
- 4) 4 ° C durante 5 min.

Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo “sándwich” para determinación de IFN- λ 1

Se empleo un kit comercial de e-bioscience para Human IL-29 (IFN lambda 1) con el número de catálogo 88-7296. Se emplearon placas Costar #9018 a las cuales se les adicionó 100 μ L de anticuerpo de captura diluido en cada uno de los pocillos. La placa se cubrió con papel plástico e incubó durante toda la noche (16-18 h) a 4°C. Al día siguiente, el líquido se decantó, se realizaron tres lavados con 250 μ L de solución amortiguadora de lavado. Se adicionó 200 μ L de solución diluyente 1X para bloquear la placa a temperatura ambiente durante mínimo una hora. Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados como se mencionó previamente. Los estándares, blancos y muestras fueron adicionadas en los pocillos correspondientes. La placa se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se realizaron lavados como previamente fueron descritos y se adicionó 100 μ L del anticuerpo de detección e incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se repitieron los pasos de lavado previamente descritos. Se adicionaron 100 μ L de la avidina-HRP a cada uno de los pocillos, la placa se cubrió con papel plástico y después con aluminio e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se repitieron los pasos de lavado previamente descritos. Se adicionó

100 μ L de solución sustrato-cromógeno a cada uno de los pocillos y se cubrió la placa con papel aluminio e incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se adicionó 50 μ L de solución stop a cada uno de los pocillos y se analizó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas para ELISA. Se trazó la curva estándar y la ecuación de la recta obtenida fue empleada para el cálculo de las concentraciones en las muestras problemas (Fig 1)

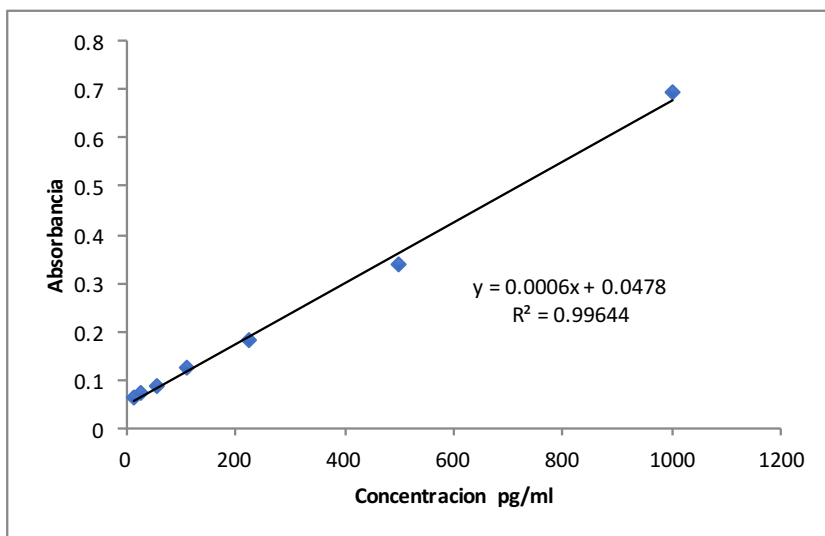


Figura 1. Curva estándar y ecuación de la recta obtenida para IFN- λ 1.

Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo “sándwich” para determinación de IFN- β

Se empleó un kit comercial de Pbl assay Science para Human IFN beta con el número de catálogo 41410. Se emplearon placas pre-cubiertas con anticuerpos. Se adicionó 50 μ l de Diluyente de muestra a los pocillos y 50 μ l de la curva Estándar diluida, blanco o muestras de ensayo. La placa se cubrió e incubó durante 1 hora. Después de 1 hora se realizaron tres lavados. Se adicionó 100 μ l de solución de anticuerpo en cada pocillo, se cubrió e incubó durante 1 hora. Nuevamente, se realizaron tres lavados y posteriormente se adicionó 100 μ l de solución de HRP diluida e incubó durante 1 hora. Finalizada la incubación se realizaron tres lavados y se adicionó 100 μ l de la Solución de Sustrato

TMB e incubó durante 15 minutos. Finalmente, se adicionó 100 μ l de la Solución de Stop. La placa fue leída en un lector de placas para ELISA a una absorbancia a 450 nm. Se trazó la curva estándar y la ecuación de la recta obtenida fue empleada para el cálculo de las concentraciones en las muestras problemas, ver (Fig 2)

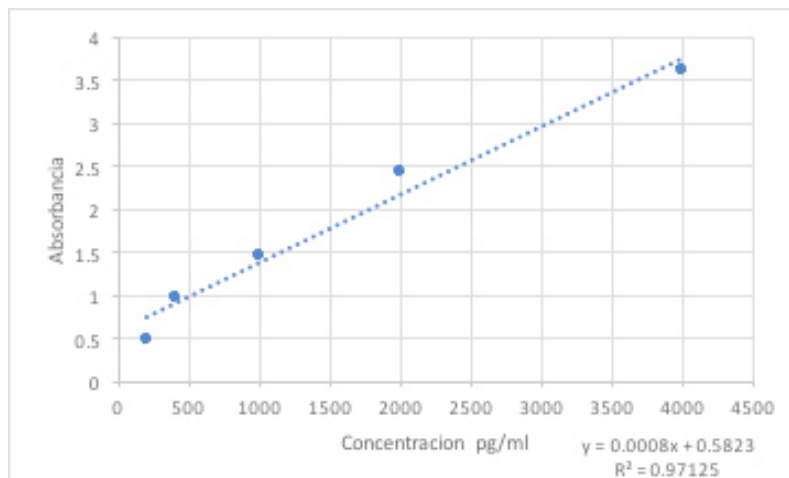


Figura 2. Curva estándar y ecuación de la recta obtenida para *IFN- β* .

Estado clínico de los pacientes

Para el caso de los niños se utilizó la siguiente encuesta diseñada por el servicio de Pediatría el Hospital Universitario (Anexo A).

Dependiendo de la sintomatología del paciente pediátrico se utilizó la siguiente escala (tabla 3) para clasificarlos en Leve, Moderado y Grave.

Tabla 3. Escala de clasificación de pacientes pediátricos

<u>Clasificación</u>	<u>Síntomas</u>					
	Fiebre	Rinorrea	Disnea	Tos	Hiporexia	Astenia
Leve		-		-		
Moderado	-	-		-	-	-
Grave	-	-	-	-	-	-

Para el caso de los adultos se utilizó la encuesta realizada por Cohen et al. 1999 y Oshansky et al. 2014 (Anexo B)

De esta encuesta se utilizó la siguiente escala para clasificar a los pacientes.

Escala

- 0= sin síntomas
- 1= síntomas leves
- 2= síntomas moderados
- 3= síntomas graves

Según el puntaje se clasifican los pacientes de la siguiente manera (tabla 4):

Tabla 4. Escala de clasificación pacientes adultos

<u>Clasificación</u>		
Leve	Moderado	Grave
0-8 puntos	9-16 puntos	17-24 puntos

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizaron pruebas de Correlación de Spearman, prueba de U de Mann Whitney, análisis de la varianza ANOVA y Kruskal Wallis, Prueba de Dunn, Prueba de chi-cuadrada. Se tomó como p significativa toda aquella < 0.05 . se utilizó el software Graphpad Prism versión 7.

RESULTADOS

Resultados

Pacientes

Se analizaron un total 212 muestras de IRA, donde en un estudio previo de Arredondo-Loza trabajo con 100 pacientes adultos los cuales se identificaron 43 casos de monoinfección por rinovirus, virus Sincitial respiratorio y Metaneumovirus humano. De las 112 muestras de pacientes pediátricos solo se encontraron 26 casos de monoinfección por los virus anteriormente mencionados. En la identificación del agente etiológico el rinovirus fue el agente que afectaba más comúnmente a nuestra población adulta. El agente viral mas frecuente encontrado en ambas poblaciones fue el RSV. Todas las muestras fueron analizadas para descartar el agente etiológico bacteriano más frecuente de IRA (*S. pneumoniae*), ver tabla 5. **Las fechas de recolección de muestras se encuentran identificadas en la figura 3.**

Tabla 5. Pacientes adultos y pediátricos monoinfectados con Rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.

Virus	No. de pacientes adultos	No. de pacientes pediátricos	Total
Rinovirus	6 (13.95%)	9 (20.93%)	15(34.88%)
RSV	8 (18.60%)	13 (30.23%)	21(48.83%)
HMPV	3 (6.97%)	4 (9.30%)	7(16.27%)
Total	17 (40%)	26 (60%)	43(100%)

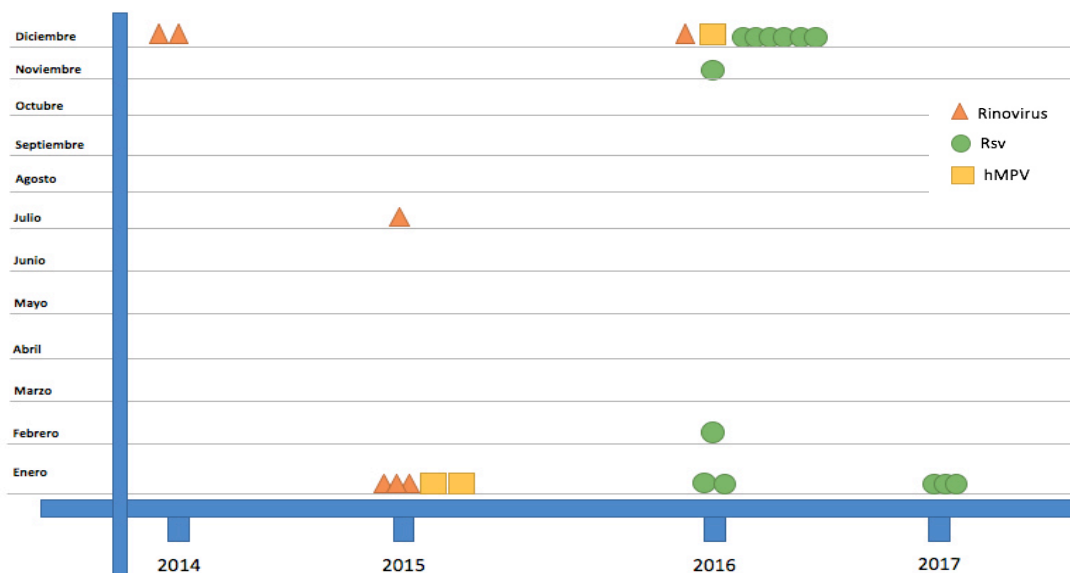


Figura 3. Fechas de toma de muestras de los pacientes mono infectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.

Características de la población

En este estudio, los pacientes adultos tenían un rango de edad de 22-69 años abarcando paciente incluso de la tercera edad, sin embargo la media de edad fue de 39 años. La mayoría de los pacientes fueron del sexo femenino. En el caso de los pacientes pediátricos el rango de edad fue de 6 días de nacido hasta 8 meses de edad con una media de 3 meses. Los pacientes reclutados fueron 100% a término y la mayoría de ellos recibió seno materno por lo menos durante 6 meses. El resumen de las características de la población se puede observar en la tabla 4. Se incluyeron controles para los grupos infectados, los cuales se encontraron pareados por edad y por genero con los grupos controles ($P > 0.05$), ver tabla 5. Las características específicas de los pacientes adultos y pediátricos infectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano se encuentran descritos en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características de las poblaciones de pacientes adultos y pediátricos con IRA.

Casos de población adulta	
Rango de edad	22-69 años
Media de edad	39 años
Masculino	59%
Femenino	41%
Casos de población pediátrica	
Rango de edad	.2 meses- 8 meses
Media de edad	3 meses
Masculino	50%
Femenino	50%
Seno Materno	89% recibieron seno materno
Prematuro	100 % a termino
Hospitalizados	12 (60%)
Ambulatorios	8 (40%)

Tabla 7. Poblaciones de estudios y controles estuvieron pareadas por edad y genero.

Adultos	Casos N=17	Controles N=9	P
Masculino	41% (7)	33.3% (3)	>0.05
Femenino	59% (10)	66.7% (6)	
Edad(años)	40.2	40.1	>0.05
Pediátricos	Casos N=20	Controles N=5	P
Masculino	50% (10)	60% (3)	>0.05
Femenino	50% (10)	40% (2)	
Edad (meses)	3.3	7.5	>0.05

*Prueba X².

La población adulta se caracterizó por tener una media de edad de 40 años, los pacientes del sexo femenino fueron los más comúnmente reclutados. La mayoría de los pacientes no presentaba antecedentes alérgicos ni de Diabetes Mellitus (tabla 8).

Tabla 8. Características clínicas y sociodemográficas específicas de población adulta monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.

Características		Número de pacientes (n=17)	
Genero	Masculino	8(47.05%)	
	Femenino	9(52.95%)	
Alérgicos	Si	5(29.41%)	
	No	12(70.58%)	
Fumadores	Si	3 (17.64%)	
	No	14(82.35%)	
Diabéticos	Si	1(5.88%)	
	No	16(94.11%)	
Vacuna vs Influenza	Si	4(23.52%)	
	No	13(76.47%)	
Edad (media años± DE)		40.88 ± 17.09	

La población pediátrica se caracterizó por tener una media de edad de 97 días de nacidos, la mayoría de ellos no fue prematuro al momento de nacer y es importante destacar que la mayoría recibió alimentación con seno materno por al menos 6 meses.

Un 46% de nuestra población se encontró ingresada al hospital con un estado clínico más grave. (Tabla 9)

Tabla 9. Características clínicas y sociodemográficas específicas de población pediátrica monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano.

Características		Número de pacientes (n=26)	
Genero	Masculino	10(38.46%)	
	Femenino	10(38.46%)	
	No evaluable*	6(23.07%)	
Prematuro	Si	2(7.69%)	
	No	18(69%)	
	No evaluable*	6(23.07%)	
Seno Materno	Si	17(73.91%)	
	No	2(7.69%)	
	No evaluable*	7(26.92%)	
Guardería	Si	1(3.84%)	
	No	18(69.23%)	
	No evaluable*	7(26.92%)	
Exposición Humo de Cigarro	Si	8(30.76%)	
	No	10(38.46%)	
	No evaluable*	8(30.76%)	
Admisión Hospitalaria	Ambulatorio	8(30.76%)	
	Internado	12(46%)	
	No evaluable*	6(23.07%)	
Edad al momento de internamiento(media en días \pm DE)		71.25 \pm 51.61	
Edad de los Pacientes(media en días \pm DE)		97.2 \pm 68.95	

Niveles de IFN- λ 1 en pacientes mono infectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus

Los niveles de IFN- λ 1 fueron similares en pacientes adultos y pediátricos mono infectados. En un análisis de correlación entre la carga viral y los niveles de IFN- λ 1 de los pacientes mono infectados, esta no fue significativa ($P>0.05$), fig 4. Resultados similares fueron obtenidos en la correlación entre la edad de los pacientes y los niveles de IFN- λ 1 ($P>0.05$) Los análisis de la concentración de IFN- λ 1 y el género de los pacientes pediátricos no fue significativo ($P>0.05$), pero en los pacientes adultos se encontró una mayor producción de IFN- λ 1 en la población masculina comparada con la femenina ($P<0.01$), figura 5.

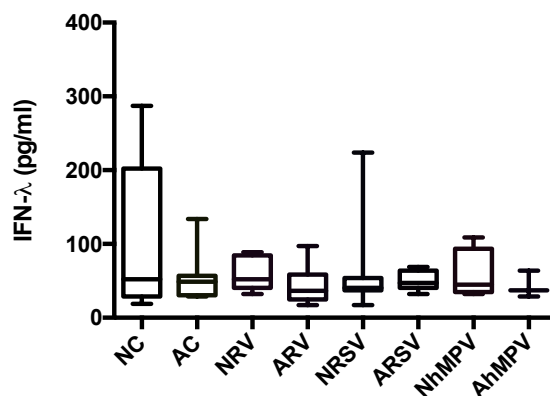


Figura 4. Niveles de IFN- λ 1 en mucosa nasal de las diferentes poblaciones mono infectadas con los diferentes virus estudiados. NC: control pediátrico, AC: adulto control, NRV: Pediátrico rinovirus, ARV: adulto rinovirus, NRSV: pediátrico RSV, ARSV: adulto RSV, NhMPV: pediátrico hmpv, AhMPV: adulto hMPV. ANOVA comparación múltiple, $P>0.05$.

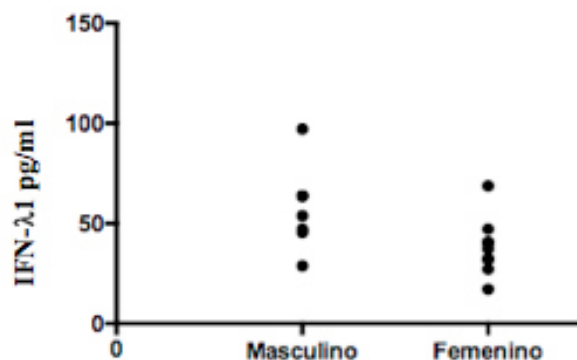


Figura 5. Los pacientes masculinos monoinfectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano presentaron mayores niveles de IFN-λ1. Prueba U Man Whitney, $P < 0.01$.

La exposición al humo de tabaco o sus componentes pueden afectar los niveles de IFNs. Una porción de la población pediátrica incluida en el estudio reportaron exposición a humo de cigarro, por lo que se analizó los niveles de IFN-λ1. El análisis mostró que no existe diferencia significativa entre los niveles de IFN-λ1 entre pacientes pediátricos monoinfectados con exposición al humo de cigarro y aquellos sin exposición al humo de cigarro ($P > 0.05$). Contrario a los pacientes pediátricos, en la población de pacientes adultos monoinfectados se encontró que los pacientes fumadores presentaron menores niveles de IFN-λ1 comparado con aquellos no fumadores ($P = 0.01$), ver figura 6.

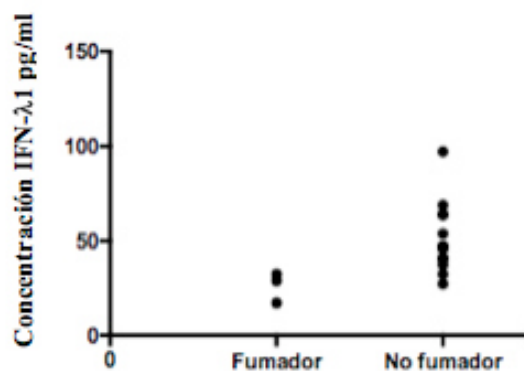


Figura 6. Los pacientes adultos fumadores con monoinfección presentan menores concentraciones de IFN-λ1, Prueba U de Mann Whitney ($P = 0.01$)

Los niveles de IFN- λ 1 fueron similares en pacientes con mono infección alérgicos y no alérgicos de ambas poblaciones ($P>0.05$). Por otro lado, los pacientes pediátricos hospitalizados mostraron una mayor concentración de IFN- λ 1 comparado con los pacientes mono infectados ambulatorios ($P<0.05$), ver figura 7 y 8

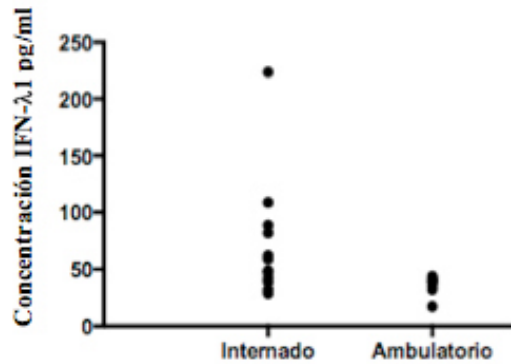


Figura 7. Los pacientes hospitalizados infectados con Rinovirus, RSV y Hmpv muestran mayores niveles de IFN- λ 1 comparado con los ambulatorios, prueba U Mann Whitney ($P=0.02$).

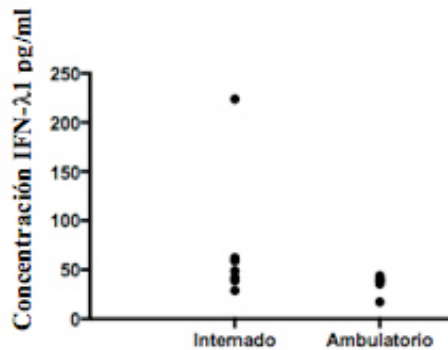


Figura 8. Los pacientes hospitalizados infectados con RSV muestran mayores niveles de IFN- λ 1 comparado con los ambulatorios, prueba U Mann Whitney ($P=0.02$).

Niveles de IFN- β en pacientes mono infectados con rinovirus, RSV y Metaneumovirus

Los niveles de IFN- β fueron analizados en muestras de los pacientes mono infectados. Las concentraciones de IFN- β fueron muy variantes inclusive en muchas de las muestras no se logró la detección. Se analizó los niveles de IFN- β e IFN- λ en cada una de las muestras y se observa un predominio muy claro del IFN- λ en mucosa nasal de pacientes con mono infección, ver figura 9.

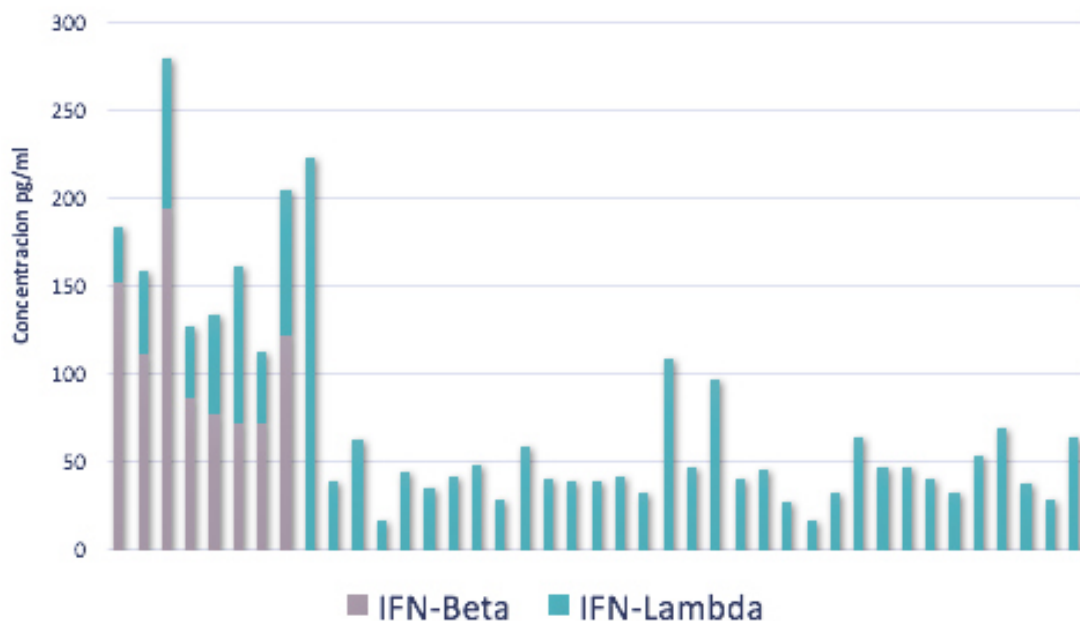


Figura 9. Los niveles de IFN- λ predominan sobre IFN- β .

En aquellos pacientes adultos monoinfectados con el Metaneumovirus humano, los niveles de IFN- β correlacionaron negativamente ($P < 0.0001$), ver figura 10.

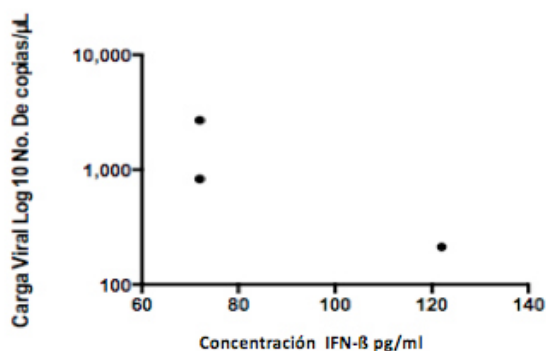


Figura 10. Correlación de los niveles de IFN- β y la carga viral del hMPV. Prueba de correlación de Spearman ($P < 0.0001$, $r = -0.86$).

Estado clínico de los pacientes y su asociación con los agentes virales

En nuestro trabajo se encontró que el rinovirus humano afectó con mayor frecuencia y gravedad a la población adulta mientras que el RSV afectó de la misma manera a la población pediátrica. El hMPV afectó más frecuentemente a los pacientes pediátricos, ver tablas 10, 11 y 12.

Tabla 10. Gravedad clínica de la infección viral en la población adulta y pediátrica.

Escala de estado clínico					
Agente	Leve	Moderado	Grave	Población	Total
Rinovirus (n=9)	2 (22.22%)	1 (11.11%)	6 (66.66%)	Adultos 6 (66.66%) Pediátricos 3 (33.33%)	100%
Virus Sincitial Respiratorio (n=21)	5 (23.80%)	5 (23.80%)	11 (52.28%)	Adultos 8 (38.09%) Pediátricos 13 (61.90)	100%
Metaneumovirus (n=7)	3 (42.85%)	2 (28.57%)	2 (28.57%)	Adultos 3(42.85%) Pediátricos 4(57.14%)	100%

Tabla 11. Gravedad clínica de la infección viral en la población adulta.

Agente (ADULTOS) n=17	Leve	Moderado	Grave	Total
Rinovirus (n=6)	2(33.33%)	1(16.66%)	3(50%)	100%
Virus Sincitial Respiratorio (n=8)	4(50%)	3(37.5%)	1(12.5%)	100%
Metaneumovirus(n=3)	2(66.66%)	1(33.33%)	0	100%

Tabla 12. Gravedad clínica de la infección viral en la población pediátrica.

Agente (PEDIATRICOS)* n=20	Leve	Moderado	Grave	Total
Rinovirus(n=3)	0	0	3(100%)	100%
Virus Sincitial Respiratorio(n=13)	1(7.69%)	2(15.38%)	10(76.92%)	100%
Metaneumovirus (n=4)	1(25%)	1(25%)	2(50%)	100%

La mayoría de los pacientes adultos infectados con el rinovirus humano eran del sexo femenino y poseían una edad mayor a 50 años, no se encontró ningún paciente alérgico ni diabético. Los síntomas más comunes fueron la fiebre, tos, cuerpo cortado así como garganta irritada y la mayoría se encontró como un estado clínico grave, ver tabla 13.

Los pacientes adultos infectados con RSV mostraron como síntomas más común la tos y la mayoría fue clasificado como moderado respecto a la gravedad clínica, ver tabla 14. Los pacientes con antecedentes alérgicos infectados con este virus presentaron una mayor carga viral, ver figura 11. En el caso de el hMPV la mayoría de los pacientes presentaba menos de 50 años de edad, la clasificación de la gravedad clínica de estos pacientes fue en su mayoría leve, ver tabla 15.

Tabla 13 Características de los pacientes adultos monoinfectados con rinovirus y sus cargas virales.

Rinovirus(n=6)			
Características		N	Carga Viral (promedio \pm DE)
Genero	Masculino	2(33.33%)	156.55 \pm 192.23
	Femenino	4(66.66%)	24860.33 \pm 49354.47
Edad	19-50 años	2(33.33%)	133.14 \pm 159.12

	>50 años	4(66.66%)	24872.04 ± 49346.69
Alérgicos	Si	0	±
	No	6(100%)	16625.74 ± 40302.19
Fumadores	Si	1(16.66%)	245.66 ±
	No	5(83.33%)	19901.75 ± 44157.00
Diabéticos	Si	0	±
	No	6(100%)	16625.74 ± 40302.19
Vacuna vs Influenza	Si	1(16.66%)	98892 ±
	No	5(83.33%)	172.48 ± 109.61
Estornudo	Si	4(66.66%)	154.195 ± 117.43
	No	2(33.33%)	49568.83 ± 69753.49595
Rinorrea	Si	5(83.33%)	172.48 ± 109.61
	No	1(16.66%)	98892 ±
Garganta Irritada	Si	5(83.33%)	172.48 ± 109.61
	No	1(16.66%)	98892 ±
Tos	Si	5(83.33%)	172.48 ± 109.61
	No	1(16.66%)	98892 ±
Cuerpo Cortado	Si	5(83.33%)	172.48 ± 109.61
	No	1(16.66%)	98892 ±
Cefalea	Si	4(66.66%)	154.195 ± 117.43
	No	2(33.33%)	49568.83 ± 69753.49
Escalofríos	Si	3(50%)	139.35 ± 139.15
	No	3(50%)	33112.12 ± 56967.04
Fiebre	Si	1(16.66%)	20.62 ±
	No	5(83.33%)	19946.76 ± 44131.78
Clasificación Clínica	Leve	2(33.33%)	49498.48 ± 69852.98
	Moderado	1(16.66%)	20.62 ±
	Grave	3(50%)	245.62 ± 46.88

Tabla 14. Características de los pacientes adultos mono infectados con RSV y sus cargas virales

Virus Sincitial Respiratorio(n=8)			
Características		N	Carga Viral (promedio \pm DE)
Genero	Masculino	4(50%)	450 \pm 417.45
	Femenino	4(50%)	1123 \pm 991.37
Edad	19-50 años	6(75%)	828.833 \pm 915.4193
	>50 años	2(25%)	659.5 \pm 379.71
Alérgicos	Si	4(50%)	1257.25 \pm 890.43
	No	4(50%)	315.75 \pm 274.29
Fumadores	Si	1(12.5%)	2587 \pm
	No	7(87.5%)	529.28 \pm 334.72
Diabéticos	Si	1(12.5%)	391 \pm
	No	7(87.5%)	843 \pm 836.49
Vacuna vs Influenza	Si	3(37.5%)	1188 \pm 1288.82
	No	5(62.5%)	545.6 \pm 265.17
Estornudo	Si	6(75%)	815.83 \pm 933.22
	No	2(25%)	698.5 \pm 44.54
Rinorrea	Si	5(62.5%)	461.6 \pm 384.08
	No	3(37.5%)	1328 \pm 090.78
Garganta Irritada	Si	6(75%)	815.83 \pm 933.22
	No	2(25%)	698.5 \pm 44.54
Tos	Si	7(87.5%)	794.57 \pm 853.76
	No	1(12.5%)	730 \pm
Cuerpo Cortado	Si	3(37.5%)	377.66 \pm 479.59
	No	5(62.5%)	1031.8 \pm 882.44
Cefalea	Si	2(25%)	102.5 \pm 75.66
	No	6(75%)	1014.5 \pm 790.41
Escalofríos	Si	1(12.5%)	156 \pm
	No	7(87.5%)	876.57 \pm 808.58
Fiebre	Si	2(25%)	102.5 \pm 75.66

	No	6(75%)	1014.5 ± 790.41
Clasificación Clínica	Leve	4(50%)	1035 ± 1066.11
	Moderado	3(37.5%)	587 ± 471.45
	Grave	1(12.5%)	391 ±

Tabla 15. Características de los pacientes adultos mono infectados con hMPV y sus cargas virales

Metaneumovirus Humano (n=3)			
Características		N	Carga Viral (promedio ± DE)
Genero	Masculino	2(66.66%)	520.78 ± 436.20
	Femenino	1(33.33%)	2697.38 ±
Edad	19-50 años	2(66.66%)	1763.3 ± 1320.98
	>50 años	1(33.33%)	212.34 ±
Alérgicos	Si	1(33.33%)	829.22 ±
	No	2(66.66%)	1454.86 ± 1757.18
Fumadores	Si	1(33.33%)	829.22 ±
	No	2(66.66%)	1454.86 ± 1757.18
Diabéticos	Si	0	±
	No	3(100%)	1246.31 ± 1293.95
Vacuna vs Influenza	Si	1(33.33%)	829.22 ±
	No	2(66.66%)	1454.86 ± 1757.18
Estornudo	Si	2(66.66%)	1763.3 ± 1320.98
	No	1(33.33%)	212.34 ±
Rinorrea	Si	2(66.66%)	1763.3 ± 1320.98

	No	1(33.33%)	212.34 ±
Garganta Irritada	Si	2(66.66%)	1763.3 ± 1320.98
	No	1(33.33%)	212.34 ±
Tos	Si	2(66.66%)	1763.3 ± 1320.98
	No	1(33.33%)	212.34 ±
Cuerpo Cortado	Si	1(33.33%)	2697.38 ±
	No	2(66.66%)	520.78 ± 436.20
Cefalea	Si	1(33.33%)	2697.38 ±
	No	2(66.66%)	520.78 ± 436.20
Escalofríos	Si	1(33.33%)	2697.38 ±
	No	2(66.6%)	520.78 ± 436.20
Fiebre	Si	1(33.33%)	2697.38 ±
	No	2(66.66%)	520.78 ± 436.20
Clasificación Clínica	Leve	2(66.66%)	520.78 ± 436.20
	Moderado	1(33.33%)	2697.38 ±
	Grave	0	±

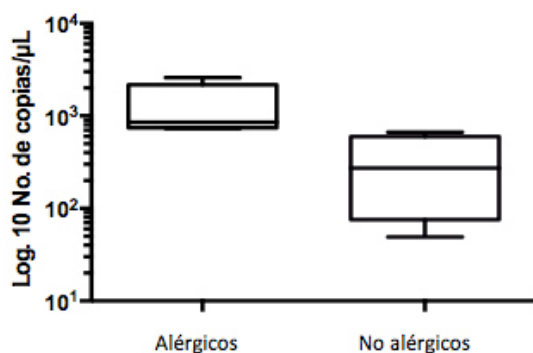


Figura 11. Pacientes con antecedentes alérgicos(4) infectados con RSV mostraron una mayor carga viral comparada con aquellos no alérgicos(4). U Mann Whitney p= 0.01

La gravedad clínica de los pacientes adultos no mostró ninguna correlación con la edad los mismos, ver tabla 16.

Tabla 16. Edad y gravedad clínica de los pacientes adultos infectados por Rinovirus, RSV, Metaneumovirus humano

Agente Etiológico	Características		N	Clasificación Clínica(n)			P
				Leve	Moderado	Grave	
Rinovirus	Edad	19-50 años	2 (33.33%)	0	1	1	0.61
		>50 años	4(66.66%)	2	0	2	
RSV	Edad	19-50 años	6(75%)	4	2	0	0.31
		>50 años	2(25%)	0	1	1	
hMPV	Edad	19-50 años	2(66.66%)	1	1	0	0.66
		>50 años	1(33.33%)	1	0	0	

*Coeficiente de correlación de Spearman ($p \geq 0.05$)

El género de los pacientes adultos no mostró ninguna asociación con la gravedad de la enfermedad en los casos infectados por rinovirus y RSV, debido a la n de las muestras no se pudo realizar ninguna asociación para el caso de los pacientes infectados con metaneumovirus humano. Tabla 17.

Tabla 17. Género y gravedad clínica de los pacientes infectados por Rinovirus y RSV

Rinovirus(n=6)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.22
Genero	Masculino	2(33.33%)	0	1	1	
	Femenino	4(66.66%)	2	0	2	
Virus Sincitial Respiratorio(n=8)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.51
Genero	Masculino	4(50%)	2	2	0	
	Femenino	4(50%)	2	1	1	

En los pacientes pediátricos infectados con el rinovirus humano se encontró que muchos de los expedientes clínicos no contaban con la información necesaria para obtener datos de la historia clínica así como la información sociodemográfica, sin embargo se puede observar en la tabla 18 que los pacientes evaluables se encontraban en un estado clínico grave con el diagnóstico más común de bronquiolitis. Un comportamiento similar se observa en los pacientes infectados con RSV (tabla 19) en los cuales la mayoría tiene < 60 días de edad y se encuentran en un estado clínico grave con el diagnóstico más frecuente de bronquiolitis. Los casos de hMPV en nuestra población pediátrica se caracterizó porque entre los síntomas más frecuentes se encontraban la rinorrea y la tos, estos pacientes en su mayoría fueron clasificados con un estado clínico grave y casi la totalidad poseía una edad mayor de 60 días. Tabla 20.

Tabla 18. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por rinovirus humano.

Rinovirus(n=9)			
Características		N	Carga Viral (promedio± DE)
Género	Masculino	1(11.11%)	24.79 ±
	Femenino	2(22.22%)	73493400 ± 103875471.1
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Edad	≤ 60 días	2(22.22%)	73493400 ± 103875471.14
	> 60 días	1(11.11%)	176124.36 ±
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Prematuro	Si	0	±
	No	3(33.33%)	48995608.26 ± 84826187.86
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 40091.43
Seno Materno	Si	2(22.22%)	73472237.4 ± 103905399.5
	No	0	±
	No evaluable*	7(77.77%)	421750.62 ± 784931.39
Guardería	Si	0	±
	No	2(33.33%)	73472237.41 ± 103905399.5

	No evaluable*	7(77.77%)	421750.62 ± 784931.39
Exp. Humo de Cigarro	Si	1(11.11%)	146944450 ±
	No	1(11.11%)	24.79 ±
	No evaluable*	7(77.77%)	421750.62 ± 784931.39
Fiebre	Si	1(11.11%)	24.79 ±
	No	2(22.22%)	73493400 ± 103875471.1
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Rinorrea	Si	2(22.22%)	73472237.4 ± 03905399.5
	No	1(11.11%)	42350 ±
	No evaluable*	6(66.66%)	840091.43 ± 840091.43
Disnea	Si	3(33.33%)	48995608.26 ± 84826187.86
	No	0	±
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Tos	Si	2(22.22%)	73472237.4 ± 103905399.5
	No	1(11.11%)	±
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.4344
Vómito	Si	0	±
	No	2(22.22%)	73493400 ± 03875471.1
	No evaluable*	7(77.77%)	415704.16 ± 788496.00
Hiporexia	Si	1(11.11%)	42350 ±
	No	1(11.11%)	146944450 ±
	No evaluable*	7(77.77%)	415704.16 ± 788496.00
Astenia	Si	1(11.11%)	42350 ±
	No	1(11.11%)	146944450 ±
	No evaluable*	7(77.77%)	415704.16 ± 788496.00
Hospitalización	Si	3(33.33%)	48995608.26 ± 84826187.86
	No	0	±
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43

Resolución de Enfermedad	≤ 5 días	0	±
	> 5 días	3(33.33%)	48995608.26 ± 84826187.86
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Diagnóstico	Neumonía	1(11.11%)	42350 ±
	Bronquiolitis	2(22.22%)	73472237.4 ± 03905399.5
	Otro	0	±
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43
Estado clínico	Leve	0	±
	Moderado	0	±
	Grave	3(33.33%)	48995608.26 ± 84826187.86
	No evaluable*	6(66.66%)	484984.06 ± 840091.43

Tabla 19. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por RSV.

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)			
Características		N	Carga Viral (promedio±DE)
Género	Masculino	7(53.84%)	31429.46 ± 82852.48
	Femenino	6(46.15%)	800.13 ± 1261.08
Edad	≤ 60 días	7(53.84%)	31827.51 ± 82685.66
	> 60 días	6(46.15%)	335.74 ± 332.80
Prematuro	Si	2(15.38%)	109901.35 ± 973.57
	No	11(84.61%)	454.94 ± 9 73.57
Seno Materno	Si	11(84.61%)	20138.93 ± 66061.77
	No	2(15.38%)	1639.39 ± 2317.50
Guardería	Si	1(7.69%)	49.62 ±
	No	12(92.30%)	18729.78 ± 63176.53

Exp. Humo de Cigarro	Si	7(53.84%)	31920.27 ± 82644.20
	No	6(46.15%)	227.53 ± 360.47
Fiebre	Si	5(38.46%)	801.184 ± 1397.26
	No	8(61.53%)	27600.14 ± 77467.51
Rinorrea	Si	9(69.23%)	24601.16 ± 73020.51
	No	4(30.76%)	849.16 ± 1619.64
Disnea	Si	10(76.92%)	539.93 ± 126599.98
	No	3(23.07%)	73135.91 ± 126599.98
Tos	Si	12(92.30%)	18733.68 ± 63175.27
	No	1(7.69%)	2.86 ±
Vómito	Si	3(23.07%)	73172.47 ± 126568.34
	No	10(76.92%)	528.96 ± 1008.34
Hiporexia	Si	3(23.07%)	102.38 ± 85.67
	No	10(76.92%)	22449.99 ± 69180.60
Astenia	Si	4(30.76%)	901.85 ± 1585.40
	No	9(69.23%)	24577.74 ± 73029.35
Hospitalización	Si	7(53.84%)	31898.64 ± 82653.86
	No	6(46.15%)	252.76 ± 364.50

Resolución de Enfermedad	≤ 5 días	10(76.92%)	22456.09 ± 69178.41
	> 5 días	3(23.07%)	82.05 ± 100.99
Diagnóstico	Neumonía	3(23.07%)	140.41 ± 228.34
	Bronquiolitis	9(69.23%)	28030.59 ± 77300.64
	Otro	1(7.69%)	0.66 ±
Estado clínico	Leve	1(7.69%)	2.86 ±
	Moderado	2(15.38%)	109702.43 ± 155024.02
	Grave	10(76.92%)	539.93 ± 1003.60

Tabla 20. Características generales de los pacientes pediátricos infectados por hMPV.

Metaneumovirus Humano(n=4)			
Características		n	Carga Viral (promedio± DE)
Género	Masculino	2(50%)	19112.79 ± 17517.38
	Femenino	2(50%)	414.50 ± 584.78
Edad	≤ 60 días	1(25%)	1 ±
	> 60 días	3(75%)	13017.86 ±16274.94
Prematuro	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ± 14796.69
Seno Materno	Si	4(100%)	9763.64 ± 14796.69
	No	0	±
Guardería	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ± 14796.69

Exp. Humo de Cigarro	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ± 14796.69
Fiebre	Si	2(50%)	3363.56 ± 4755.38
	No	2(50%)	16163.73 ± 21687.98
Rinorrea	Si	4(100%)	9763.64 ±
	No	0	±
Disnea	Si	2(50%)	15750.22 ± 22272.76
	No	2(50%)	3777.07 ± 4170.60
Tos	Si	4(100%)	9763.64 ±
	No	0	±
Vómito	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ±
Hiporexia	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ±
Astenia	Si	0	±
	No	4(100%)	9763.64 ±
Hospitalización	Si	2(50%)	15750.22 ± 22272.76
	No	2(50%)	3777.07 ± 4170.60
Resolución de Enfermedad	≤ 5 días	4(100%)	9763.64 ±
	> 5 días	0	±

Diagnóstico	Neumonía	2(50%)	19112.79 ± 17517.38
	Bronquiolitis	1(25%)	1 ±
	Otro	1(25%)	828.01 ±
Estado clínico	Leve	1(25%)	828.01 ±
	Moderado	1(25%)	6726.13 ±
	Grave	2(50%)	15750.22 ± 22272.76

La mayoría de los pacientes infectados con RSV son < de 60 días de edad y se puede apreciar una tendencia que estos progresan con una menor gravedad clínica, sin embargo no se obtuvieron datos significativos ($P>0.05$). Lo contrario se puede observar en los casos de hMPV, los cuales la mayoría son > de 60 días de edad y de igual manera que en RSV no se obtuvieron diferencias significativas en relación a la gravedad clínica, ver tabla 21. Los pacientes pediátricos infectados con rinovirus no se pudieron clasificar de esta manera debido a la falta de información de la historia clínica en el expediente. En un comportamiento similar a los pacientes adultos no se pudo encontrar asociación alguna entre el género y la gravedad de la infección en la población pediátrica infectada con RSV y hMPV, ver tabla 22.

Tabla 21. Edad y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV y hMPV .

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		N	Clasificación Clínica (n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.06
Edad	≤ 60 días	7(53.84%)	1	2	4	
	> 60 días	6(46.15%)	0	0	6	

Metaneumovirus Humano(n=4)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.33
Edad	≤ 60 días	1(25%)	0	0	1	
	> 60 días	3(75%)	1	1	1	

*Coeficiente de correlación de Spearman ($p=>0.05$)

Tabla 22. Género y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV y Metaneumovirus humano

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.61
Genero	Masculino	7(53.84%)	1	1	5	
	Femenino	6(46.15%)	0	1	5	

Metaneumovirus Humano(n=4)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.36
Genero	Masculino	2(50%)	0	1	1	
	Femenino	2(50%)	1	0	1	

*Chi-cuadrada ($p=>0.05$)

La mayoría de los pacientes pediátricos infectados con RSV recibieron alimentación con seno materno por lo menos durante 6 meses, sin embargo no se encontró asociación alguna entre este antecedente y la gravedad clínica de la enfermedad, ver tabla 23. Debido a la falta de información del expediente clínico no se pudo realizar el análisis para el rinovirus y hMPV.

Tabla 23. Antecedente de alimentación con seno materno y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.71
Seno Materno	Si	11(84.61%)	1	2	8	
	No	2(15.38%)	0	0	2	

*Chi-cuadrada ($p=> 0.05$)

Los pacientes pediátricos infectados con RSV en su mayoría presentaban el antecedente de no ser prematuros; la mayoría de estos se encontraba en un estado clínico grave a pesar de dicho antecedente. Sin embargo no se encontraron datos significativos en el análisis, ver tabla 24. Ninguno de los pacientes con infecciones por rinovirus y metaneumovirus humano presentaban antecedentes de prematuros .

Tabla 23. Antecedente de alimentación con seno materno y gravedad clínica de los pacientes pediátricos infectados con RSV.

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		N	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.32
Prematuro	Si	2(15.38%)	0	1	1	
	No	11(84.61%)	1	1	9	

*Chi-cuadrada ($p=> 0.05$)

En los pacientes pediátricos el diagnostico de bronquiolitis fue el más comúnmente asociada a la infección por RSV, mientras que la neumonía fue la más frecuente a la infección con hMPV. Sin embargo no se obtuvieron datos significativos a la asociación de estos diagnósticos con la gravedad de la enfermedad, ver tabla 24.

Tabla 24. Diagnóstico y la gravedad de la enfermedad de pacientes infectados con RSV y hMPV.

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.36
Diagnóstico	Neumonía	3(23.07%)	1	0	3	
	Bronquiolitis	9(69.23%)	0	0	6	
	Otro	1(7.69%)	0	0	3	

Metaneumovirus Humano(n=4)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.33
Diagnóstico	Neumonía	2(50%)	0	1	1	
	Bronquiolitis	1(25%)	0	0	1	
	Otro	1(25%)	1	0	0	

*Prueba estadística coeficiente de correlación de Spearman ($p=>0.05$)

Para encontrar una asociación parecida a los pacientes adultos con el antecedente de tabaquismo se analizó a los pacientes pediátricos infectados con RSV con el antecedente de exposición de humo de cigarro en su hogar y a pesar de que la mayoría presentaba dicho antecedente no se encontró asociación alguna con la gravedad de la enfermedad, ver tabla 25.

Tabla 25. Antecedente de exposición a humo de cigarro y la gravedad de la enfermedad de pacientes infectados con RSV.

Virus Sincitial Respiratorio(n=13)						
Características		n	Clasificación Clínica(n)			P
			Leve	Moderado	Grave	0.22
Exp. Humo de tabaco	Si	7(53.84%)	0	2	5	
	No	6(46.15%)	1	0	5	

*Chi-cuadrada ($p=>0.05$)

DISCUSIÓN

Discusión

Las infecciones respiratorias agudas en México son un problema de salud importante debido a que presentan una gran morbilidad, tan solo en las primeras semanas del año 2017 se han presentado aproximadamente 5 millones de casos de estas infecciones (68). En un estudio en México se demostró que los virus más frecuentes fueron el rinovirus, RSV y Metaneumovirus humano (69), lo cual corresponde a los virus estudiados en nuestro trabajo. Este mismo estudio establece que el virus con mayor incidencia es el Rinovirus difiriendo de nuestros resultados en los que en nuestra población estudiada el agente con mayor incidencia fue el RSV. Esta variación podría ser debido a que nuestra n pediátrica es mayor que la n de adultos pudiendo interferir con las estadísticas. Nuestro virus con mayor incidencia después del RSV fue el Rinovirus humano seguido del Metaneumovirus humano con la menor incidencia, sin embargo este último virus así como el RSV afectaron más a la población pediátrica que a la adulta coincidiendo con diferentes estudios (29, 69-71). Esto posiblemente debido a que los pacientes pediátricos tienen una menor respuesta antiviral con una menor producción de Interferones comparada con los adultos (72). En nuestro estudio se encontró que el virus responsable de un estado clínico más grave en los pacientes fue el RSV, seguido del Rinovirus y el Metaneumovirus. Está demostrado que RSV es responsable de un gran número de bronquiolitis y neumonías en pacientes pediátricos, siendo la población adulta más afectada por esta última (73-76). Nuestro estudio difiere a diferentes trabajos donde establecen que el Rinovirus humano es el responsable de aproximadamente la mitad de todas las IRAs en todas las edades (24, 77). Esto posiblemente debido a lo mencionado previamente y en este estudio se trabajó con monoinfecciones y quizás en aquellos estudios la población fue de monoinfecciones y co-infecciones, además de la n estudiada. Sin embargo nuestros resultados coinciden con las complicaciones asociadas a este virus como la neumonía en ambas poblaciones. El Metaneumovirus humano al igual que el RSV ha sido asociado a una mayor incidencia en pacientes pediátricos y con complicaciones más graves como la bronquiolitis y neumonía ocasionando internamiento de los pacientes (73, 75, 78). Esto coincidiendo con nuestros resultados los cuales indican que la mayor población afectada es la pediátrica tanto en incidencia como en gravedad del estado clínico siendo la

bronquiolitis el diagnóstico más común ante esta infección así como en la de RSV. Dentro de las variable estudiadas se encontró una correlación positiva entre los pacientes adultos que presentaban algún antecedente alérgico y la carga viral del RSV, este fenómeno no fue significado cuando se realizó con Rinovirus. Esto difiere de lo reportado en el caso del Rinovirus tanto en pacientes adultos y pediátricos alérgicos o asmáticos los cuales no mostraron diferencias significativas con los controles no alérgicos (79). Es importante comentar que la toma de muestras de exudado faríngeo y lavado nasal para el análisis de los tres diferentes virus se realizó en temporada de invierno del 2014-2017 (figura 1), esto debido a la gran demanda de consulta médica por infecciones respiratorias presentada en dicha temporada comparada con la del resto del año. Diferentes estudios indican que estos 3 virus presentan una mayor incidencia en dichos meses y que la temperatura y la humedad juegan un papel importante en la fisiopatología de la infección del tracto respiratorio (69, 80).

Los interferones son el principal mecanismo de respuesta antiviral, en nuestro trabajo nos enfocamos en cuantificar interferón $\lambda 1$ (IFN- $\lambda 1$) así como IFN- β . Diferentes trabajos como el de Selvaggi y colaboradores han encontrado que los niveles de expresión del IFN- $\lambda 1$ dependen del virus infectante siendo mayores con el RSV, además reportaron una correlación positiva con el cuadro clínico grave de los pacientes (81). Esto último coincide con nuestros hallazgos, los cuales indican una correlación positiva entre la concentración del IFN- $\lambda 1$ y el estado clínico de los pacientes, presentando así los pacientes pediátricos internados mayores cantidades. Nosotros no encontramos una diferencia significativa en los niveles de interferón entre los 3 diferentes virus evaluados. El efecto del humo del cigarro en el cuerpo humano es conocido y específicamente el efecto que tiene en el epitelio respiratorio como la afección de la motilidad ciliar, la destrucción del epitelio respiratorio afectando la señalización adecuada en respuesta a los patógenos así como la disminución en la producción de agente surfactante (82). Lo anterior, significaría que las personas fumadoras tendrían menores de niveles de IFN- $\lambda 1$, lo cual coincide con nuestros resultados en los pacientes adultos. Reportes has demostrado los efectos directos de los componentes químicos sobre el epitelio respiratorio donde inhiben la señalización de la respuesta antiviral al ser

antagonistas de RIG-1 e impedir la producción de IFN y probablemente también por degradación por ubiquitinación de los receptores IFNAR (83, 84). Existen numerosas diferencias en la respuesta inmune entre géneros, como por ejemplo en las vías de señalización de los TLR en especial el TLR-7 es mayormente expresada en el sexo femenino mientras que el TLR-9 en el masculino e incluso se ha demostrado que los pacientes de género masculino producen una menor cantidad de IFN tipo I (85, 86). Contrario a esos reportes, nuestros resultados nuestros pacientes de sexo masculino produjeron una mayor cantidad de IFN- λ 1 comparada con las del sexo femenino. En la actualidad la mayoría de los estudios de este tipo se realizan con los niveles de IFN tipo I y se necesita más información acerca de los IFN tipo III para encontrar una posible explicación del comportamiento de nuestros resultados.

En nuestro análisis para IFN- β encontramos donde solamente 8 muestras de pacientes de los 41 existentes superaron los niveles mínimos de detección de la ELISA (50pg/ml), y todos los pacientes presentaron IFN- λ 1. Todos los pacientes adultos con infección con hMPV y solo 1 con RSV fueron detectados, en cambio con los pacientes pediátricos solamente se detectaron 3 pacientes con Rinovirus y uno con hMPV. Nuestros resultados concuerdan con lo previamente reportado por dos grupos de investigación en los cuales indican que los interferones tipo III predominan ante los tipo I durante una infección viral respiratoria, específicamente en infecciones por Influenza A y RSV (60, 87). Cabe destacar que estos últimos estudios mencionados se realizaron en ratones y en cultivos celulares, siendo esto una fortaleza de nuestro trabajo ya que se realizó en pacientes humanos con monoinfección con virus respiratorios. Otros autores afirman que este tipo de IFN tipo I tienen una actividad “temprana” durante infecciones respiratorias por hMPV (88) y estudios similares se han realizado con RSV (89). Una probable causa del porque los niveles de IFN- λ 1 fueron mayores que los de IFN- β es por el tiempo de evolución de los pacientes los cuales tenían la mayoría mas de 3 días de evolución. Estos hallazgos requieren aún mas investigación debido a la alta similitud de estos dos interferones e incluso esta descrito que ambos comparten la misma vía de IRF 3 y NF-KB (90, 91). Además de las medidas preventivas y terapéuticas establecidas para las infecciones respiratorias (8), se ha descrito que el probable uso de los interferones puede

llegar a tener un uso terapéutico en los pacientes específicamente hablando en enfermedades que afecten no solamente el epitelio de tracto respiratorio, sino el digestivo así como el vaginal (92, 93). Este tipo de IFN tipo III tiene efectos aún más potentes que los del tipo I, esto se cree que sea debido a una falta de inhibición por retroalimentación en la cascada de señalización (94), sin embargo el mecanismo no está bien establecido aún por lo que se necesitan más estudios para dilucidarlo.

Se encontraron diferentes áreas de oportunidad para poder mejorar el trabajo en un futuro. En nuestro estudio así como en todos los estudios los cuales trabajan con pacientes humanos nos encontramos con diferentes situaciones los cuales impedían mejorar las variables estudiadas de la tesis. Entre estas la recolección de los datos de los pacientes en los expedientes cinco del hospital, esto debido a que muchos de los expedientes no presentaban una información completa para poder obtener datos sociodemográficos de los pacientes. En el caso del enrolamiento de los pacientes adultos y pediátricos muchos de los tutores o pacientes se negaron al participar en este estudio impidiendo así obtener una n aún mayor.

CONCLUSIÓN

Conclusión

Los virus respiratorios estudiados inducen la producción de IFN tipo I y III en la mucosa nasal de los pacientes infectados, los niveles de estos fueron afectados por factores propios de la infección y de los pacientes; y finalmente el IFN- λ 1 se predominó en estas infecciones.

PERSPECTIVAS

Perspectivas

- Analizar los Genes Estimulados por Interferones (ISG)
- Analizar diferentes PRRs como TLRs y RIG-1
- Aumentar la n de estudio
- Estudiar las poblaciones más susceptibles por estacionalidad de las infecciones
- Descartar la presencia de *H. Influenzae*

REFERENCIAS

Referencias

1. Epidemiologico B. Vigilancia Epidemiologica Infecciones Respiratorias Agudas. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica 2013;30.
2. Organization WH. Enfermedades respiratorias agudas con tendencia epidemica y pandemica 2007.
3. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. Clinical microbiology reviews. 2010;23(1):74-98.
4. Obasi CN, Barrett B, Brown R, Vrtis R, Barlow S, Muller D, et al. Detection of viral and bacterial pathogens in acute respiratory infections. The Journal of infection. 2014;68(2):125-30.
5. Foundation WL. Four Million Deaths Each Year Caused by Acute Respiratory Infections . 2017.
6. Eric A. F. Simoes TC, Jeffrey Chow, Sonbol A. Shahid- Salles, Ramanan Laxminarayan, and T. Jacob John. Acute respiratory infection in children. Disease control priorities in developing countries. 2006.
7. Lehmann ASMaD. Acute respiratory infections (ARI) in children: prospects for prevention. Vaccine 1998;16.
8. G. Michael Allan MD BAMCP. Prevention and treatment of common cold: making sense of the evidence. CMAJ. 2014.
9. Seo YB, Song JY, Choi MJ, Kim IS, Yang TU, Hong K-W, et al. Etiology and Clinical Outcomes of Acute Respiratory Virus Infection in Hospitalized Adults. Infection & Chemotherapy. 2014;46(2):67.
10. Cots JM, Alos JI, Barcena M, Boleda X, Canada JL, Gomez N, et al. [Recommendations for management of acute pharyngitis in adults]. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2016;34(9):585-94.
11. Candice L. Bjornson MD DWJM. Croup in children. CMAJ. 2013.
12. James D. Cherry M, MSc. Croup. NEJM. 2008.
13. Tulunay OE. Laryngitis--diagnosis and management. Otolaryngologic clinics of North America. 2008;41(2):437-51, ix.
14. al ASLe. The diagnosis and management of acute otitis media. American academy of pediatrics. 2013;131.
15. HUI CP. Acute otitis externa Canadian pediatric society 2013.
16. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, et al. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2015;152(2 Suppl):S1-S39.
17. Walk P. Bronchitis (acute). Clinical Evidence Respiratory Disorders. 2010.
18. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, Alverson BK, Baley JE, Gadomski AM, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. Pediatrics. 2014;134(5):e1474-502.
19. Arshad H, Fasanya A, Cheema T, Singh AC. Acute Pneumonia. Critical care nursing quarterly. 2016;39(2):148-60.

20. M. Macedo SM. Infecciones respiratorias. Temas de bacteriología y virología médica 2006:137.
21. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2014;25:45-52.
22. Kennedy JL, Turner RB, Braciale T, Heymann PW, Borish L. Pathogenesis of rhinovirus infection. Current opinion in virology. 2012;2(3):287-93.
23. Lewis-Rogers N, Seger J, Adler FR. Human rhinovirus diversity and evolution: How strange the change from Major to minor. J Virol. 2017.
24. Jacobs SE, Lamson DM, St George K, Walsh TJ. Human rhinoviruses. Clinical microbiology reviews. 2013;26(1):135-62.
25. Orga PL. Respiratory syncytial virus: The virus, the disease and the immune response. Pediatric Respiratory. 2004.
26. Boivin JPaG. The distinguishing features of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus. Reviews in Medical Virology. 2010.
27. Gamino-Arroyo AE, Moreno-Espinosa S, Llamosas-Gallardo B, Ortiz-Hernandez AA, Guerrero ML, Galindo-Fraga A, et al. Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. Influenza Other Respir Viruses. 2017;11(1):48-56.
28. Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus--a comprehensive review. Clinical reviews in allergy & immunology. 2013;45(3):331-79.
29. Haas LE, Thijsen SF, van Elden L, Heemstra KA. Human metapneumovirus in adults. Viruses. 2013;5(1):87-110.
30. Abara S. Metapneumovirus humano: Un nuevo agente en IRA alta y baja. Neumología Pediátrica. 2006.
31. Jennifer E. Schuster M, John V. Williams, MD. Human Metapneumovirus. infectious diseases. 2013.
32. Chaplin DD. Overview of the immune response. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.
33. Jeffrey M. Greve GD, Ann M. Meyer, Carla P. Forte, Susan C. Yost, Christoph W. Marior, Michael E. Kamarck and Allan McClelland. The Major Humas Rhinovirus Receptor is ICAM-1. Molecular Therapeutics. 1989;56:839-47.
34. Johnson SM, McNally BA, Ioannidis I, Flano E, Teng MN, Oomens AG, et al. Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures. PLoS Pathog. 2015;11(12):e1005318.
35. Garbiella Cseke MSM. Integrin avBi promotes infection by human metapneumovirus. PNAS. 2009;106:1546-71.
36. Osamu Takeuchi SA. Innate Immunity to virus infection. Immunological Reviews. 2009;227:75-86.
37. Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. J Mol Biol. 2014;426(6):1246-64.

38. Wang Q, Nagarkar DR, Bowman ER, Schneider D, Gosangi B, Lei J, et al. Role of double-stranded RNA pattern recognition receptors in rhinovirus-induced airway epithelial cell responses. *J Immunol.* 2009;183(11):6989-97.
39. Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Frontiers in immunology.* 2014;5:342.
40. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011;34(5):680-92.
41. Creagh EM, O'Neill LAJ. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in Immunology.* 2006;27(8):352-7.
42. Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *BioFactors.* 2009;35(1):14-20.
43. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Seminars in immunopathology.* 2016;38(4):471-82.
44. Fensterl V, Chattopadhyay S, Sen GC. No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annual Review of Virology.* 2015;2(1):549-72.
45. Hansen TH, Bouvier M. MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(7):503-13.
46. X. Filella RM, AM. Ballesta. Estructura y funcion de las citocinas. *Med Integ.* 2002;39.
47. Alves MP, Schogler A, Ebener S, Vielle NJ, Casaulta C, Jung A, et al. Comparison of innate immune responses towards rhinovirus infection of primary nasal and bronchial epithelial cells. *Respirology.* 2016;21(2):304-12.
48. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology.* 2005;175(6):3463-8.
49. Teijaro JR. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. *Current topics in microbiology and immunology.* 2015;386:3-22.
50. Spann KM, Baturcam E, Schagen J, Jones C, Straub CP, Preston FM, et al. Viral and host factors determine innate immune responses in airway epithelial cells from children with wheeze and atopy. *Thorax.* 2014;69(10):918-25.
51. Ritchie AI, Jackson DJ, Edwards MR, Johnston SL. Airway Epithelial Orchestration of Innate Immune Function in Response to Virus Infection. A Focus on Asthma. *Annals of the American Thoracic Society.* 2016;13 Suppl 1:S55-63.
52. Wishaupt JO, van der Ploeg T, de Groot R, Versteegh FG, Hartwig NG. Single- and multiple viral respiratory infections in children: disease and management cannot be related to a specific pathogen. *BMC infectious diseases.* 2017;17(1):62.
53. Nascimento MS, Souza AVd, Ferreira AVdS, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LVFd. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics.* 2010;65(11):1133-7.
54. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012;6(1):71-7.
55. Cebey-Lopez M, Herberg J, Pardo-Seco J, Gomez-Carballa A, Martinon-Torres N, Salas A, et al. Does Viral Co-Infection Influence the Severity of Acute Respiratory Infection in Children? *PLoS One.* 2016;11(4):e0152481.

56. Gulraiz F, Bellinghausen C, Dentener MA, Reynaert NL, Gaajetaan GR, Beuken EV, et al. Efficacy of IFN-lambda1 to protect human airway epithelial cells against human rhinovirus 1B infection. *PLoS One*. 2014;9(4):e95134.
57. Peng T, Kotla S, Bumgarner RE, Gustin KE. Human rhinovirus attenuates the type I interferon response by disrupting activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*. 2006;80(10):5021-31.
58. Scagnolari C, Midulla F, Nenna R, Papoff P, Antonelli G, Pierangeli A. Rhinovirus species/genotypes and interferon-lambda: subtypes, receptor and polymorphisms - missing pieces of the puzzle of childhood asthma? *The European respiratory journal*. 2017;49(3).
59. K.C. A. RSV Bronchiolitis. national medical association. 2005;97.
60. Okabayashi T, Kojima T, Masaki T, Yokota S, Imaizumi T, Tsutsumi H, et al. Type-III interferon, not type-I, is the predominant interferon induced by respiratory viruses in nasal epithelial cells. *Virus research*. 2011;160(1-2):360-6.
61. Cormier SA, Shrestha B, Saravia J, Lee GI, Shen L, DeVincenzo JP, et al. Limited type I interferons and plasmacytoid dendritic cells during neonatal respiratory syncytial virus infection permit immunopathogenesis upon reinfection. *J Virol*. 2014;88(16):9350-60.
62. McCutcheon KM, Jordan R, Mawhorter ME, Noton SL, Powers JG, Fearn R, et al. The Interferon Type I/III Response to Respiratory Syncytial Virus Infection in Airway Epithelial Cells Can Be Attenuated or Amplified by Antiviral Treatment. *J Virol*. 2015;90(4):1705-17.
63. Guerrero-Plata A, Baron S, Poast JS, Adegboyega PA, Casola A, Garofalo RP. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections. *J Virol*. 2005;79(16):10190-9.
64. Scagnolari C, Trombetti S, Selvaggi C, Carbone T, Monteleone K, Spano L, et al. In vitro sensitivity of human metapneumovirus to type I interferons. *Viral immunology*. 2011;24(2):159-64.
65. Banos-Lara Mdel R, Harvey L, Mendoza A, Simms D, Chouljenko VN, Wakamatsu N, et al. Impact and regulation of lambda interferon response in human metapneumovirus infection. *J Virol*. 2015;89(1):730-42.
66. Guerrero-Plata A, Kolli D, Hong C, Casola A, Garofalo RP. Subversion of pulmonary dendritic cell function by paramyxovirus infections. *J Immunol*. 2009;182(5):3072-83.
67. McAvlin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(10):3446-51.
68. SINAVE/DGE/SALUD. Direccion general de epidemiologia Infecciones Respiratorias Agudas 2017.
69. Fernandes-Matano L, Monroy-Munoz IE, Angeles-Martinez J, Sarquiz-Martinez B, Palomec-Nava ID, Pardave-Alejandro HD, et al. Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176298.

70. Cheemarla NR, Guerrero-Plata A. Immune Response to Human Metapneumovirus Infection: What We Have Learned from the Mouse Model. *Pathogens*. 2015;4(3):682-96.
71. Tabarani CM, Bonville CA, Suryadevara M, Branigan P, Wang D, Huang D, et al. Novel Inflammatory Markers, Clinical Risk Factors and Virus Type Associated With Severe Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2013;32(12):e437-e42.
72. Marr N, Wang TI, Kam SH, Hu YS, Sharma AA, Lam A, et al. Attenuation of respiratory syncytial virus-induced and RIG-I-dependent type I IFN responses in human neonates and very young children. *J Immunol*. 2014;192(3):948-57.
73. Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol*. 2006;35(1):46-50.
74. Lagare A, Mainassara HB, Issaka B, Sidiki A, Tempia S. Viral and bacterial etiology of severe acute respiratory illness among children < 5 years of age without influenza in Niger. *BMC infectious diseases*. 2015;15:515.
75. Moe N, Krokstad S, Stenseng IH, Christensen A, Skanke LH, Risnes KR, et al. Comparing Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus: Viral Co-Detections, Genotypes and Risk Factors for Severe Disease. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170200.
76. Sentilhes AC, Choumlivong K, Celhay O, Sisouk T, Phonekeo D, Vongphrachanh P, et al. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(6):1070-8.
77. To KK, Lau SK, Chan KH, Mok KY, Luk HK, Yip CC, et al. Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients. *J Clin Virol*. 2016;77:85-91.
78. Anderson EJ, Simoes EA, Buttery JP, Dennehy PH, Domachowske JB, Jensen K, et al. Prevalence and Characteristics of Human Metapneumovirus Infection Among Hospitalized Children at High Risk for Severe Lower Respiratory Tract Infection. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2012;1(3):212-22.
79. Kennedy JL, Shaker M, McMeen V, Gern J, Carper H, Murphy D, et al. Comparison of viral load in individuals with and without asthma during infections with rhinovirus. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(5):532-9.
80. Makinen TM, Juvonen R, Jokelainen J, Harju TH, Peitso A, Bloigu A, et al. Cold temperature and low humidity are associated with increased occurrence of respiratory tract infections. *Respiratory medicine*. 2009;103(3):456-62.
81. Selvaggi C, Pierangeli A, Fabiani M, Spano L, Nicolai A, Papoff P, et al. Interferon lambda 1-3 expression in infants hospitalized for RSV or HRV associated bronchiolitis. *The Journal of infection*. 2014;68(5):467-77.
82. Mehta H, Nazzal K, Sadikot RT. Cigarette smoking and innate immunity. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2008;57(11):497-503.
83. HuangFu WC, Liu J, Harty RN, Fuchs SY. Cigarette smoking products suppress anti-viral effects of Type I interferon via phosphorylation-dependent downregulation of its receptor. *FEBS letters*. 2008;582(21-22):3206-10.

84. Wu W, Patel KB, Booth JL, Zhang W, Metcalf JP. Cigarette smoke extract suppresses the RIG-I-initiated innate immune response to influenza virus in the human lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(6):L821-30.
85. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):626-38.
86. Torcia MG, Nencioni L, Clemente AM, Civitelli L, Celestino I, Limongi D, et al. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. *PLoS One*. 2012;7(6):e39853.
87. Jewell NA, Cline T, Mertz SE, Smirnov SV, Flano E, Schindler C, et al. Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection in vivo. *J Virol*. 2010;84(21):11515-22.
88. Hastings AK, Erickson JJ, Schuster JE, Boyd KL, Tollefson SJ, Johnson M, et al. Role of type I interferon signaling in human metapneumovirus pathogenesis and control of viral replication. *J Virol*. 2015;89(8):4405-20.
89. Marcel A. Schijf MVL, Debby Kruijsen, Nathalie O.P van Uden, Johan Garssen, Frank E.J Coenjaerts, Belinda van't Land, Grada M.van Bleek. Respiratory Syncytial Virus Induced Type I IFN Production by pDC is regulated by RSV-Infected Airway Epithelial Cells, RSV-Exposed Monocytes and Virus Specific Antibodies. *PLoS One*. 2013;8(11).
90. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(10):7576-81.
91. Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN Regulatory Factor Family Members Differentially Regulate the Expression of Type III IFN (IFN- γ) Genes. *The Journal of Immunology*. 2007;179(6):3434-42.
92. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, et al. Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J Virol*. 2010;84(11):5670-7.
93. Johanna Potta T^{Mi, c,1}, Markus Mordstein^{b,c,1}, Claudia U. Duerra, Thomas Michiels^d, Silvia Stockinger^{a,2}, Peter Staeheli^{b,2}, and Mathias W. Horne^{a,2}. IFN- λ determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *PNAS*. 2011;108.
94. Francois-Newton V, Magno de Freitas Almeida G, Payelle-Brogard B, Monneron D, Pichard-Garcia L, Piehler J, et al. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon alpha response. *PLoS One*. 2011;6(7):e22200.

ANEXOS

Anexos

Anexo A. Encuesta realizada a pacientes pediátricos para la obtención de historia clínica y datos socio-demográficos.

Ficha de identificación

Fecha	Registro	Nombre	Edad	Sexo	Lugar de consulta
--------------	----------	--------	------	------	-------------------

Antecedentes personales patológicos

Infecciones respiratorias			Antecedentes atópicos					
1-3 al año	4-6 al año	>6 al año	Ninguno	Asma	Rinitis alérgica	Dermatitis atópica	Comorbilidades	Otra

Antecedentes personales no patológicos

Seno materno				Asiste a guardería		Exposición a humo de cigarro			
Prematuro	Nunca	< de 6 meses	6-12 meses	Si	No	Ninguno	Diariamente	Ocasional	Motivo de la consulta

Cuadro clínico

							<i>Evolución</i>		
Fiebre	Rinorrea	Disnea	Tos	Vomito	Hiporexia	Astenia	<24 horas	24-72 horas	>72 horas

Diagnóstico clínico

Neumonía	Bronquiolitis	CRUP	Infecciones vías aéreas superiores	Otro
----------	---------------	------	------------------------------------	------

Manejo médico previo

Especificar antibioticoterapia

Sintomático	Antibioticoterapia	amx	amc/clav	cef	tmp/smx	Otros
-------------	--------------------	-----	----------	-----	---------	-------

Evolución

Resolución de la sintomatología

Ambulatorio	Internamiento	24-72 horas	3-5 días	6-10 días	>10 días
-------------	---------------	-------------	----------	-----------	----------

Anexo B. Encuesta realizada a pacientes adultos para la obtención de historia clínica y datos socio-demográficos.

Ficha de identificación

Nombre	Edad	Peso	Talla	Temperatura
Alergias	Fumador	Diabético		
Vacuna Vs influenza				
Fecha inicio de los síntomas				
Medicamentos				

Síntomas del día 1 de toma de muestra
Estornudo
Rinorrea
Garganta irritada
Tos
Cuerpo cortado
Cefalea
Escalofríos
Fiebre

Resumen autobiográfico

Jorge Armando González Chapa

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunología
Médica

**Tesis: NIVELES DE INTERFERONES TIPO I Y TIPO III EN MUCOSA NASAL DE
PACIENTES INFECTADOS CON VIRUS RESPIRATORIOS**

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacido el 6 de enero de 1989, hijo de Armando González Benavides y Liliana Sandra Chapa Tamez

Actualmente residente de la ciudad de Monterrey Nuevo León

Educación: Egresado de Universidad Autónoma del Noreste de bachillerato, Saltillo Coahuila, 2006. Egresado de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L Monterrey N.L

2013. Cumplió su servicio social en el Departamento de Urgencias así como en Departamento de Calidad del Hospital Universitario Dr. Jose Eleuterio González, 2014 Estancia en Texas Tech University Health Sciences Center, El Paso Texas, 2017.